

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C07K 16/00 16/28, C12N 15/63, A61K 39/395, G01N 33/53		A3	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/57150
		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:	11. November 1999 (11.11.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE99/01350		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 5. Mai 1999 (05.05.99)		Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht.	
(30) Prioritätsdaten: 198 19 846.9 5. Mai 1998 (05.05.98) DE		(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 22. Juni 2000 (22.06.00)	
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS (DE/DE); Im Neuenheimer Feld 280, D-69120 Heidelberg (DE).			
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LITTLE, Melvyn (GB/DE); Fritz-von-Briesen-Strasse 10, D-69151 Neckargemünd (DE). KIPRIYANOV, Sergej [RU/DE]; Furtwänglerstrasse 3, D-69121 Heidelberg (DE).			
(74) Anwalt: HUBER, Bernard; Huber & Schüssler, Truderinger Strasse 246, D-81825 München (DE).			

(54) Title: MULTIVALENT ANTIBODY CONSTRUCTS

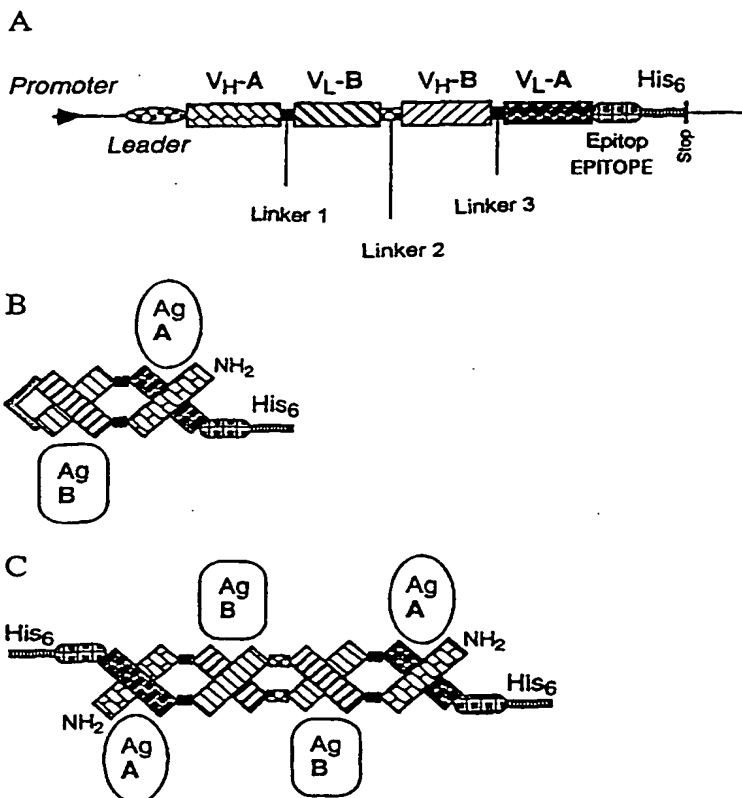
(54) Bezeichnung: MULTIVALENTE ANTIKÖRPER-KONSTRUKTE

(57) Abstract

The invention relates to a multivalent F_v antibody construct comprising at least four variable domains which are connected to one another via peptide linkers 1, 2 and 3. The invention also relates to expression plasmids which code for such an F_v antibody construct. In addition, the invention relates to a method for producing the F_v antibody constructs and to the use thereof.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein multivalentes F_v-Antikörper-Konstrukt mit mindestens vier variablen Domänen, die über die Peptidlinker 1, 2 und 3 miteinander verbunden sind. Ferner betrifft die Erfindung Expressionsplasmide, die für ein solches F_v-Antikörper-Konstrukt codieren, und ein Verfahren zur Herstellung der F_v-Antikörper-Konstrukte sowie deren Verwendung.



THIS PAGE IS BLANK

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C07K 16/00		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/57150
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 11. November 1999 (11.11.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE99/01350		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 5. Mai 1999 (05.05.99)			
(30) Prioritätsdaten: 198 19 846.9 5. Mai 1998 (05.05.98) DE			
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS [DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 280, D-69120 Heidelberg (DE).			
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LITTLE, Melvyn [GB/DE]; Fritz-von-Briesen-Strasse 10, D-69151 Neckargemünd (DE). KIPRIYANOV, Sergej [RU/DE]; Furtwänglerstrasse 3, D-69121 Heidelberg (DE).			
(74) Anwalt: HUBER, Bernard; Huber & Schüssler, Truderinger Strasse 246, D-81825 München (DE).		Veröffentlicht Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.	

(54) Title: MULTIVALENT ANTIBODY CONSTRUCTS

(54) Bezeichnung: MULTIVALENTE ANTIKÖRPER-KONSTRUKTE

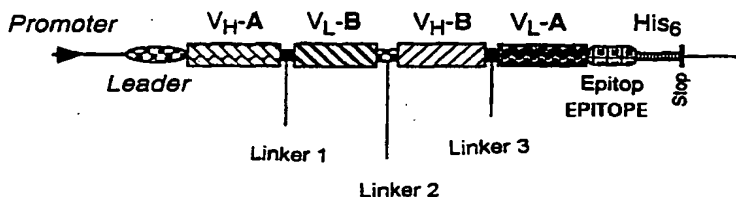
(57) Abstract

The invention relates to a multivalent F_v antibody construct comprising at least four variable domains which are connected to one another via peptide linkers 1, 2 and 3. The invention also relates to expression plasmids which code for such an F_v antibody construct. In addition, the invention relates to a method for producing the F_v antibody constructs and to the use thereof.

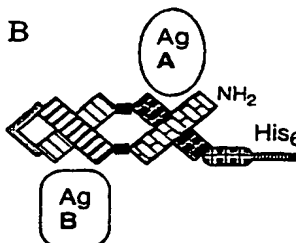
(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein multivalentes F_v-Antikörper-Konstrukt mit mindestens vier variablen Domänen, die über die Peptidlinker 1, 2 und 3 miteinander verbunden sind. Ferner betrifft die Erfindung Expressionsplasmide, die für ein solches F_v-Antikörper-Konstrukt codieren, und ein Verfahren zur Herstellung der F_v-Antikörper-Konstrukte sowie deren Verwendung.

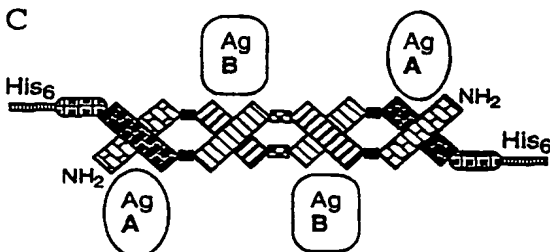
A



B



C



LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauritanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

Multivalente Antikörper-Konstrukte

Die vorliegende Erfindung betrifft multivalente F_v -Antikörper-Konstrukte, sie kodierende Expressionsplasmide, und ein Verfahren zur Herstellung der F_v -Antikörper-Konstrukte sowie ihre Verwendung.

Natürliche Antikörper sind Dimere und werden daher als bivalent bezeichnet. Sie weisen vier variable Domänen, nämlich zwei V_H - und zwei V_L -Domänen, auf. Die variablen Domänen dienen als Bindungsstellen für ein Antigen, wobei eine Bindungsstelle aus einer V_H - und einer V_L -Domäne ausgebildet ist. Natürliche Antikörper erkennen jeweils ein Antigen, wodurch sie auch als monospezifisch bezeichnet werden. Ferner weisen sie auch konstante Domänen auf. Diese tragen zur Stabilität der natürlichen Antikörper bei. Andererseits sind sie auch für unerwünschte Immunreaktionen mitverantwortlich, die entstehen, wenn natürliche Antikörper verschiedener Tierarten wechselseitig verabreicht werden.

Zur Vermeidung solcher Immunreaktionen werden Antikörper konstruiert, denen die konstanten Domänen fehlen. Insbesondere sind dies Antikörper, die nur noch die variablen Domänen aufweisen. Solche Antikörper werden mit F_v -Antikörper-Konstrukten bezeichnet. Diese liegen häufig in Form einzelkettiger, sich miteinander gepaarter Monomere vor.

Es hat sich allerdings gezeigt, daß F_v -Antikörper-Konstrukte nur eine geringe Stabilität aufweisen. Ihre Verwendbarkeit für therapeutische Zwecke ist daher stark eingeschränkt.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, einen Antikörper bereitzustellen, mit dem unerwünschte Immunreaktionen vermieden werden können. Ferner soll er eine Stabilität aufweisen, die ihn für therapeutische Zwecke

einsetzbar macht.

Erfindungsgemäß wird dies durch die Gegenstände in den Patentansprüchen erreicht.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein multivalentes F_v -Antikörper-Konstrukt, das eine große Stabilität aufweist. Ein solches eignet sich für diagnostische und therapeutische Zwecke.

Die vorliegende Erfindung beruht auf den Erkenntnissen des Anmelders, daß die Stabilität eines F_v -Antikörper-Konstruktes erhöht werden kann, wenn dieses in Form eines einzelkettigen Dimeres vorliegt, bei dem die vier variablen Domänen über drei Peptidlinker miteinander verbunden sind. Ferner hat der Anmelder erkannt, daß sich das F_v -Antikörper-Konstrukt mit sich selbst faltet, wenn der mittlere Peptidlinker eine Länge von etwa 10 - 30 Aminosäuren aufweist. Des weiteren hat der Anmelder erkannt, daß sich das F_v -Antikörper-Konstrukt mit anderen F_v -Antikörper-Konstrukten zusammenfaltet, wenn der mittlere Peptidlinker eine Länge von etwa bis zu 10 Aminosäuren aufweist, wodurch ein multimeres, d.h. multivalentes, F_v -Antikörper-Konstrukt erhalten wird. Auch hat der Anmelder erkannt, daß das F_v -Antikörper-Konstrukt multispezifisch sein kann.

Erfindungsgemäß werden die Erkenntnisse des Anmelders genutzt, ein multivalentes F_v -Antikörper-Konstrukt bereitzustellen, das mindestens vier variable Domänen umfaßt, die über die Peptidlinker 1, 2 und 3 miteinander verbunden sind.

Der Ausdruck " F_v -Antikörper-Konstrukt" weist auf einen Antikörper hin, der variable Domänen, nicht aber konstante Domänen aufweist.

Der Ausdruck "multivalentes F_v -Antikörper-Konstrukt" weist auf einen F_v -Antikörper hin, der mehrere variable Domänen, jedoch mindestens vier aufweist. Solches wird erreicht, wenn sich das einzelkettige F_v -Antikörper-Konstrukt mit sich selbst faltet, wodurch vier variable Domänen gegeben sind, oder sich mit anderen einzel-

kettigen F_v -Antikörper-Konstrukten zusammenfaltet. In letzterem Fall liegt ein F_v -Antikörper-Konstrukt vor, das 8, 12, 16, etc. variable Domänen aufweist. Günstig ist es, wenn das F_v -Antikörper-Konstrukt vier oder acht variable Domänen aufweist, d.h. es ist bi- oder tetravalent (vgl. Fig. 1). Ferner können die variablen Domänen gleich oder verschieden voneinander sein, wodurch das Antikörper-Konstrukt ein oder mehrere Antigene erkennt. Vorzugsweise erkennt das Antikörper-Konstrukt ein oder zwei Antigene, d.h. es ist mono- bzw. bispezifisch. Beispiele solcher Antigene sind die Proteine CD19 und CD3.

Der Ausdruck "Peptidlinker 1, 3" weist auf einen Peptidlinker hin, der geeignet ist, variable Domänen eines F_v -Antikörper-Konstruktes miteinander zu verbinden. Der Peptidlinker kann jegliche Aminosäuren enthalten, wobei die Aminosäuren Glycin (G), Serin (S) und Prolin (P) bevorzugt sind. Die Peptidlinker 1 und 3 können gleich oder verschieden voneinander sein. Ferner kann der Peptidlinker eine Länge von etwa 0 - 10 Aminosäuren aufweisen. In ersterem Fall ist der Peptidlinker lediglich eine Peptidbindung aus dem COOH-Rest einer der variablen Domänen und dem NH_2 -Rest einer anderen der variablen Domänen. Vorzugsweise weist der Peptidlinker die Aminosäuresequenz GG auf.

Der Ausdruck "Peptidlinker 2" weist auf einen Peptidlinker hin, der geeignet ist, variable Domänen eines F_v -Antikörper-Konstruktes miteinander zu verbinden. Der Peptidlinker kann jegliche Aminosäuren enthalten, wobei die Aminosäuren Glycin (G), Serin (S) und Prolin (P) bevorzugt sind. Ferner kann der Peptidlinker eine Länge von etwa 3 - 10 Aminosäuren, insbesondere 5 Aminosäuren, und ganz besonders die Aminosäuresequenz GGPGS, aufweisen, wodurch erreicht wird, daß sich das einzelkettige F_v -Antikörper-Konstrukt mit anderen einzelkettigen F_v -Antikörper-Konstrukten zusammenfaltet. Des weiteren kann der Peptidlinker eine Länge von etwa 11 - 20 Aminosäuren, insbesondere 15 - 20 Aminosäuren, und ganz besonders die Aminosäuresequenz $(G_4S)_4$, aufweisen, wodurch erreicht wird, daß sich das einzelkettige F_v -Antikörper-Konstrukt mit sich selbst faltet.

Ein erfindungsgemäßes F_v -Antikörper-Konstrukt kann durch übliche Verfahren hergestellt werden. Günstig ist ein Verfahren, bei dem für die Peptidlinker 1, 2 und 3 kodierende DNAs mit für die vier variablen Domänen eines F_v -Antikörper-Konstruktes kodierenden DNAs ligiert werden derart, daß die Peptidlinker die variablen Domänen miteinander verbinden, und das erhaltene DNA-Molekül in einem Expressionsplasmid exprimiert wird. Es wird auf die Beispiele 1 - 6 verwiesen. Hinsichtlich der Ausdrücke " F_v -Antikörper-Konstrukt" und "Peptidlinker" wird auf vorstehende Ausführungen verwiesen. Ergänzend wird auf Maniatis, T. et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory 1982, verwiesen.

DNAs, die für ein erfindungsgemäßes F_v -Antikörper-Konstrukt kodieren, sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Ferner sind Expressionsplasmide, die solche DNAs enthalten, auch Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Bevorzugte Expressionsplasmide sind pDISC3x19-LL, pDISC3x19-SL, pPIC-DISC-LL, pPIC-DISC-SL, pDISC5-LL und pDISC6-SL. Die ersteren vier wurden bei der DSMZ (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellen) am 30. April 1998 unter DSM 12150, DSM 12149, DSM 12152 bzw. DSM 12151 hinterlegt.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Kit, umfassend:

- (a) ein erfindungsgemäßes F_v -Antikörper-Konstrukt, und/oder
- (b) ein erfindungsgemäßes Expressionsplasmid, sowie
- (c) übliche Hilfsstoffe, wie Puffer, Lösungsmittel und Kontrollen.

Von den einzelnen Komponenten können ein oder mehrere Vertreter vorliegen.

Die vorliegende Erfindung stellt ein multivalentes F_v -Antikörper-Konstrukt bereit, bei dem die variablen Domänen über Peptidlinker miteinander verbunden sind. Ein solches Antikörper-Konstrukt zeichnet sich dadurch aus, daß es keine Teile enthält, die zu unerwünschten Immunreaktionen führen können. Ferner weist es eine große Stabilität auf. Des weiteren ermöglicht es mehrere Antigene gleichzeitig zu binden. Das erfindungsgemäße F_v -Antikörper-Konstrukt eignet sich daher bestens nicht nur für diagnostische, sondern auch für therapeutische Zwecke verwendet zu werden.

Solche Zwecke können hinsichtlich jeder Erkrankung, insbesondere einer viralen, bakteriellen oder Tumor-Erkrankung, gesehen werden.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen:

Fig. 1 zeigt die genetische Organisation eines erfindungsgemäßen F_v -Antikörper-Konstruktes (A) und Schemata zur Bildung eines bivalenten (B) bzw. tetravalenten F_v -Antikörper-Konstruktes (C). Ag: Antigen; His₆: sechs C-terminale Histidinreste; Stop: Stoppcodon (TAA); V_H und V_L: variable Region der schweren und der leichten Kette.

Fig. 2 zeigt das Schema zur Konstruktion der Plasmide pDISC3x19-LL und pDISC3x19-SL. c-myc: Sequenz, kodierend für ein Epitop, das von dem Antikörper 9E1 erkannt wird, His₆: Sequenz, die für sechs C-terminale Histidinreste kodiert; PelB: Signalpeptidsequenz der bakteriellen Pectatlyase (PelB-Leader); rbs: Ribosomenbindungsstelle; Stop: Stoppcodon (TAA); V_H und V_L: variable Region der schweren und der leichten Kette.

Fig. 3 zeigt ein Diagramm des Expressionsplasmids pDISC3x19-LL. 6xHis: Sequenz, die für sechs C-terminale Histidinreste kodiert; bla: Gen, das für β -Lactamase kodiert, die für Ampicillinresistenz verantwortlich ist; bp: Basenpaare; c-myc: Sequenz, kodierend für ein Epitop, das von dem Antikörper 9E10 erkannt wird; ColE1: Origin der DNA-Replikation; f1-IG: intergenische Region des Bakteriophagen f1; Lac P/O: wt /*lac*-Operon-Promotor/Operator; Linker 1: Sequenz, die für ein GlyGly-Dipeptid kodiert, das die V_H- und V_L-Domänen verknüpft; Linker 2: Sequenz, die für ein (Gly₄Ser)₄-Polypeptid kodiert, das die hybriden scFv-Fragmente verknüpft; Pel-B-Leader: Signalpeptidsequenz der bakteriellen Pectatlyase; rbs: Ribosomenbindungsstelle; V_H und V_L: variable Region der schweren und der leichten Kette.

Fig. 4 zeigt ein Diagramm des Expressionsplasmids pDISC3x19-SL. 6xHis: Sequenz, die für sechs C-terminale Histidinreste codiert; bla: Gen, das für β -

Lactamase kodiert, die für Ampicillinresistenz verantwortlich ist; bp: Basenpaare; *c-myc*: Sequenz, kodierend für ein Epitop, das von dem Antikörper 9E10 erkannt wird; ColE1: Origin der DNA-Replikation; f1-IG: intergenische Region des Bakteriophagen f1; Lac P/O: wt /*lac*-Operon-Promotor/Operator; Linker 1: Sequenz, die für ein GlyGly-Dipeptid codiert, das die V_H- und V_L-Domänen verknüpft; Linker 3: Sequenz, die für ein GlyGlyProGlySer-Oligopeptid codiert, das die hybriden scFv-Fragmente verknüpft; Pel-B-Leader: Signalpeptidsequenz der bakteriellen Pectatlyase; rbs: Ribosomenbindungsstelle; V_H und V_L: variable Region der schweren und der leichten Kette.

Fig. 5 zeigt die Nukleotid- und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz des durch das Expressionsplasmid pDIS3x19-LL kodierten bivalenten F_v-Antikörper-Konstruktes. *c-myc*-Epitop: Sequenz, kodierend für ein Epitop, das von dem Antikörper 9E10 erkannt wird; CDR: Komplementarität bestimmende Region; Gerüst: Gerüstregion (Framework-Region); His6-Schwanz, Sequenz, die für sechs C-terminale Histidinreste kodiert; PelB-Leader: Signalpeptidsequenz der bakteriellen Pectatlyase; RBS: Ribosomenbindungsstelle; V_H und V_L: variable Region der schweren und der leichten Kette.

Fig. 6 zeigt die Nukleotid- und die abgeleitete Aminosäuresequenz des durch das Expressionsplasmid pDISC3x19-SL kodierten tetravalenten F_v-Antikörper-Konstruktes. *c-myc*-Epitop: Sequenz, kodierend für ein Epitop, das von dem Antikörper 9E10 erkannt wird; CDR: Komplementarität bestimmende Region, Gerüst: Gerüstregion (Framework-Region); His6-Schwanz, Sequenz, die für sechs C-terminale Histidinreste kodiert; PelB-Leader: Signalpeptidsequenz der bakteriellen Pectatlyase; RBS: Ribosomenbindungsstelle; V_H und V_L: variable Region der schweren und der leichten Kette.

Fig. 7 zeigt die Nukleotid- und die abgeleitete Aminosäuresequenz einer Verbindung zwischen einem Gen, das für eine α -Faktor-Leadersequenz kodiert, und einem Gen, das für das tetravalente F_v-Antikörper-Konstrukt codiert, in dem *Pichia*-Expressionsplasmid pPIC-DISC-SL. Alpha-Faktor-Signal: Leaderpeptidsequenz des

Saccharomyces cerevisiae- α -Faktor-Sekretionssignals; V_H : variable Region der schweren Kette. Rauten zeigen die Signalspaltstellen an.

Fig. 8 zeigt die Nukleotid- und die abgeleitete Aminosäuresequenz einer Verbindung zwischen einem Gen, das für eine α -Faktor-Leadersequenz kodiert, und einem Gen, das für das bivalente F_v -Antikörper-Konstrukt codiert, in dem *Pichia* Expressionsplasmid pPIC-DISC-LL. Alpha-Faktor-Signal: Leaderpeptidsequenz des *Saccharomyces cerevisiae*- α -Faktor-Sekretionssignals; V_H : variable Region der schweren Kette. Rauten zeigen die Signalspaltstellen an.

Fig. 9 zeigt ein Diagramm des Expressionsplasmids pDISC5-LL. 6xHis: Sequenz, die für sechs C-terminale Histidinreste kodiert; bla: Gen, das für β -Lactamase kodiert, die für Ampicillinresistenz verantwortlich ist; bp: Basenpaare; *c-myc*: Sequenz, kodierend für ein Epitop, das von dem Antikörper 9E10 erkannt wird; hok-sok: Plasmid-stabilisierender DNA-Locus; LacI: Gen, das für den Lac-Repressor kodiert; Lac P/O: wt lac-Operon-Promotor/Operator; LacZ': Gen, das für das α -Peptid von β -Galactosidase kodiert; Linker 1: Sequenz, die für ein GlyGly-Dipeptid kodiert, das die V_H - und V_L -Domänen verknüpft; Linker 2: Sequenz, die für ein $(Gly_4Ser)_4$ -Polypeptid kodiert, das die hybriden scFv-Fragmente verknüpft; M13 IG: intergenische Region des Bakteriophagen M13; pBR322ori: Ursprung der DNA-Replikation; Pel-B-Leader: Signalpeptidsequenz der bakteriellen Pectatylase; rbs: Ribosomenbindungsstelle, die von dem E. coli lacZ Gen (*lacZ*), von dem Bakteriophagen T7 Gen 10 (T7g10) oder von dem E. coli *skp* Gen (*skp*) stammt; *skp*: Gen, das für den bakteriellen periplasmatischen Faktor Skp/OmpH kodiert; tHP: starker Transkriptions-Terminator; tIPP: Transkriptions-Terminator; V_H und V_L : variable Region der schweren und der leichten Kette.

Fig. 10 zeigt ein Diagramm des Expressionsplasmids pDISC6-SL. 6xHis: Sequenz, die für sechs C-terminale Histidinreste codiert; bla: Gen, das für β -Lactamase kodiert, die für Ampicillinresistenz verantwortlich ist; bp: Basenpaare; *c-myc*: Sequenz, kodierend für ein Epitop, das von dem Antikörper 9E10 erkannt wird; hok-sok: Plasmid-stabilisierender DNA-Locus; LacI: Gen, das für den Lac-Re-

pressor kodiert; Lac P/O: wt lac-Operon-Promotor/Operator; LacZ': Gen, das für das α -Peptid von β -Galactosidase kodiert; Linker 1: Sequenz, die für ein GlyGly-Dipeptid kodiert, das die V_H - und V_L -Domänen verknüpft; Linker 3: Sequenz, die für ein GlyGlyProGlySer-Oligopeptid kodiert, das die hybriden scFv-Fragmente verknüpft; M13 IG: intergenische Region des Bakteriophagen M13; pBR322ori: Ursprung der DNA-Replikation; Pel-B-Leader: Signalpeptidsequenz der bakteriellen Pectatlyase; rbs: Ribosomenbindungsstelle, die von dem E. coli lacZ Gen (lacZ), von dem Bakteriophagen T7 Gen 10 (T7g10) oder von dem E. coli skp Gen (skp) stammt; skp: Gen, das für den bakteriellen periplasmatischen Faktor Skp/OmpH kodiert; tHP: starker Transkriptions-Terminator; tIPP: Transkriptions-Terminator; V_H und V_L : variable Region der schweren und der leichten Kette.

Die Erfindung wird durch die nachfolgenden Beispiele erläutert.

Beispiel 1: Konstruktion der Plasmide pDISC3x19-LL und pDISC3x19-SL zur Expression von bivalenten, bispezifischen bzw. tetravalenten, bispezifischen F_v -Antikörper-Konstrukten in Bakterien

Die Plasmide pHOG- α CD19 und pHOG-dmOKT3, welche für die scFv-Fragmente kodieren, die von dem Hybridom HD37, das für menschliches CD19 (Kipriyanov *et al.*, 1996, *J. Immunol. Meth.* 196, 51-62) spezifisch ist, bzw. von dem Hybridom OKT3, das für menschliches CD3 (Kipriyanov *et al.*, 1997, *Protein Eng.* 10, 445-453) spezifisch ist, abgeleitet sind, wurde zur Konstruktion von Expressionsplasmiden für ein einzelkettiges F_v -Antikörper-Konstrukt verwendet. Ein PCR-Fragment 1 der V_H -Domäne von Anti-CD19, gefolgt von einem Segment, das für einen GlyGly-Linker codiert, wurde unter Verwendung der Primer DP1, 5'-TCA-CACAGAATTCTTAGATCTATTAAGAGGAGAAATTAACC, und DP2, 5'-AGCACACGATATCACCGCCAAGCTTGGGTGTTGTTTTGGC, erzeugt (vgl. Fig. 2). Das PCR-Fragment 1 wurde mit *EcoRI* und *EcoRV* gespalten und mit dem mit *EcoRI/EcoRV* linearisierten Plasmid pHOG-dmOKT3 ligiert, wodurch der Vektor pHOG19-3 erzeugt wurde. Das PCR-Fragment 2 der V_L -Domäne von Anti-CD19,

gefolgt von einem Segment, das für ein *c-myc*-Epitop und einen Hexahistidinschwanz codiert, wurde unter Verwendung der Primer DP3, 5'-AGCACA-CAAGCTTGGCGGTGATATCTTGCTCACCCAAACTCCA, und DP4, 5'-AGCA-CACTCTAGAGACACACAGATCTTTAGTGATGGTGATGGTGATGTGAGTTTAGG, erzeugt. Das PCR-Fragment 2 wurde mit *Hind*III und *Xba*I gespalten und mit dem durch *Hind*III/*Xba*I linearisierten Plasmid pHOG-dmOKT3 ligiert, wodurch der Vektor pHOG3-19 erhalten wurde (vgl. Fig. 2). Das für das hybride scFv-3-19 codierende Gen in dem Plasmid pHOG3-19 wurde mittels PCR mit den Primern Bi3sk, 5'-CAGCCGGCCATGGCGCAGGTGCAACTGCAGCAG und entweder Li-1, 5'-TATA-T A C T G C A G C T G C A C C T G G C T A C C A C C A C -CACCGGAGCCGCCACCACCGCTACCACCGCCGCCAGAACCACCACCACC-AGCGGCCGCAGCATCAGCCCG, zur Erzeugung eines langen flexiblen (Gly₄Ser)₄-inter-scFv-Linkers (PCR-Fragment 3, vgl. Fig. 2) oder Li-2, 5'-TATA-TACTGCAGCTGCACCTGCGACCCTGGGCCACCAGCGGCCGCAGCATCAGCCCG, zur Erzeugung eines kurzen, starren GGPGS-Linkers (PCR-Fragment 4, vgl. Fig. 2) amplifiziert. Die Expressionsplasmide pDISC3x19-LL und pDISC3x19-SL wurden durch Ligierung des *Ncd*/*Pvu*II-Restriktionsfragments aus pHOG19-3, umfassend das Vektorgerüst und die *Ncd*/*Pvu*II-gespaltenen PCR-Fragmente 3 bzw. 4 konstruiert (vgl. Fig. 3, 4). Die vollständige Nukleotid- und Proteinsequenzen der bivalenten bzw. tetravalenten F_v-Antikörper-Konstrukte sind in den Figuren 5 bzw. 6 angegeben.

Beispiel 2: Konstruktion der Plasmide pPIC-DISC-LL und pPIC-DISC-SL zur Expression von bivalenten, bispezifischen bzw. tetravalenten, bispezifischen F_v-Antikörper-Konstrukten in Hefe

(A) Konstruktion von pPIC-DISC-SL

Der Vektor pPICZαA (Invitrogen BV, Leek, Niederlande) zur Expression und Sekretion von rekombinanten Proteinen in der Hefe *Pichia pastoris* wurde als Ausgangsmaterial verwendet. Er enthält ein Gen, das für das *Saccharomyces cerevi-*

siae α -Faktor-Sekretionssignal codiert, gefolgt von einem Polylinker. Die Sekretion dieses Vektors beruht auf dem dominanten selektierbaren Marker, ZeocinTM, der sowohl in *Pichia* als auch in *E. coli* bifunktionell ist. Das Gen, das für das tetravalente F_v-Antikörper-Konstrukt (scDia-SL) codiert, wurde mittels PCR von der Matrize pDISC3x19-SL unter Verwendung der Primer 5-PIC, 5'-CCGTGAAT-TCCAGGTGCAACTGCAGCAGTCTGGGGCTGAACTGGC, und pSEXbN 5'-GGTC-GACGTTAACCGACAAACAACAGATAAAACG amplifiziert. Das so erhaltene PCR-Produkt wurde mit *EcoRI* und *XbaI* gespalten und in mit *EcoRI/XbaI* linearisiertes pPICZ α A ligiert. Es wurde das Expressionsplasmid pPIC-DISC-SL erhalten. Die Nukleotid- und Proteinsequenzen des tetravalenten F_v-Antikörper-Konstruktes sind in Fig. 7 gezeigt.

(B) Konstruktion von pPIC-DISC-LL

Die Konstruktion von pPIC-DISC-LL wurde auf der Grundlage von pPICZ α A (Invitrogen BV, Leek, Niederlande) und pDISC3x19-LL (vgl. Fig. 3) durchgeführt. Die Plasmid-DNA pPICZ α A wurde mit *EcoRI* gespalten. Die überstehenden 5'-Enden wurden unter Verwendung eines Klenow-Fragments der *E. coli*-DNA-Polymerase I aufgefüllt. Die so erhaltene DNA wurde mit *XbaI* gespalten, und das große Fragment, umfassend den pPIC-Vektor, wurde isoliert. Analog wurde die DNA von pDISC3x19-LL mit *NcoI* gespalten und mit einem Klenow-Fragment behandelt. Nach der Spaltung mit *XbaI* wurde ein kleines Fragment, umfassend ein für den bivalenten F_v-Antikörper kodierendes Gen, isoliert. Dessen Ligierung mit einer pPIC-abgeleiteten Vektor-DNA ergab das Plasmid pPIC-DISC-LL. Die Nukleotid- und Proteinsequenz des bivalenten F_v-Antikörper-Konstruktes sind in Fig. 8 gezeigt.

Beispiel 3: Expression des tetravalenten bzw. bivalenten F_v-Antikörper-Konstruktes in Bakterien

E. coli/XL1-Blue-Zellen (Stratagene, La Jolla, CA), die mit den Expressionsplasmiden pDISC3x19-LL bzw. pDISC3x19-SL transformiert worden waren, wurden

über Nacht in 2xYT-Medium mit 50 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin und 100 mM Glucose (2xYT_{GA}) bei 37°C gezüchtet. 1:50-Verdünnungen der Übernachtskulturen in 2xYT_{GA} wurden als Kolbenkulturen bei 37°C unter Schütteln mit 200 UpM gezüchtet. Als die Kulturen einen OD₆₀₀-Wert von 0,8 erreicht hatten, wurden die Bakterien durch 10minütige Zentrifugation mit 1500 g bei 20°C pelletiert und in dem gleichen Volumen eines frischen 2xYT-Mediums, das 50 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin und 0,4 M Saccharose enthielt, resuspendiert. IPTG wurde bis zu einer Endkonzentration von 0,1 mM zugesetzt, und das Wachstum wurde bei Raumtemperatur (20-22°C) 18-20 h fortgesetzt. Die Zellen wurden durch 10minütige Zentrifugation mit 5000 g bei 4°C geerntet. Der Kulturüberstand wurde zurückgehalten und auf Eis gelagert. Um die löslichen periplasmatischen Proteine zu isolieren, wurden die pelletierten Bakterien in 5% des Anfangsvolumens an eiskalter 50 mM Tris-HCl, 20% Saccharose, 1 mM EDTA, pH 8,0, resuspendiert. Nach einer 1stündigen Inkubation auf Eis unter gelegentlichem Rühren wurden die Sphäroplasten mit 30.000 g 30 min bei 4°C zentrifugiert, wobei der lösliche periplasmatische Extrakt als Überstand und die Sphäroplasten mit dem unlöslichen periplasmatischen Material als Pellet erhalten wurden. Der Kulturüberstand und der lösliche periplasmatische Extrakt wurden vereinigt, durch weitere Zentrifugation (30.000 g, 4°C, 40 min) geklärt. Das rekombinante Produkt wurde durch Ammoniumsulfatfällung (Endkonzentration 70% Sättigung) eingeeengt. Das Proteinpräzipitat wurde durch Zentrifugation (10.000 g, 4°C, 40 min) gewonnen und in 10% des Anfangsvolumens an 50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 7,0, aufgelöst. Eine immobilisierte Metallaffinitätschromatographie (IMAC) wurde bei 4°C unter Verwendung einer 5 ml Säule an chelatierender Sepharose (Pharmacia), die mit Cu²⁺ beladen war und mit 50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 7,0 (Startpuffer) equilibriert worden war, durchgeführt. Die Probe wurde durch ihr Leiten über die Säule aufgeladen. Sie wurde dann mit zwanzig Säulenvolumina Startpuffer, gefolgt von Startpuffer mit 50 mM Imidazol, bis die Absorption bei 280 nm des Effluenten minimal war, gewaschen (etwa dreißig Säulenvolumina). Das absorbierte Material wurde mit 50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 250 mM Imidazol, pH 7,0, eluiert.

Die Proteinkonzentrationen wurden mit dem Bradford-Farbstoffbindungstest (1976,

Anal. Biochem., 72, 248-254) unter Verwendung des Bio-Rad(München, Deutschland)-Proteinassaykits bestimmt. Die Konzentrationen der gereinigten tetravalenten bzw. bivalenten F_v-Antikörper-Konstrukte wurden aus den A₂₈₀-Werten unter Verwendung der Extinktionskoeffizienten $\epsilon^{1\text{mg/ml}} = 1,96$ bzw. 1,93 bestimmt.

Beispiel 4: Expression des tetravalenten bzw. bivalenten Antikörper-Konstruktes in der Hefe *Pichia pastoris*

Kompetente *P. pastoris* GS155-Zellen (Invitrogen) wurden in Gegenwart von 10 µg Plasmid-DNA von pPIC-DISC-LL bzw. pPIC-DISC-SL, die mit *Sad* linearisiert worden war, elektroporiert. Die Transformanten wurden 3 Tage bei 30°C auf YPD-Platten, die 100 µg/ml ZeocinTM enthielten, selektiert. Die Klone, die bivalente bzw. tetravalente F_v-Antikörper-Konstrukte sezernierten, wurden durch Plattenscreening unter Verwendung eines anti-c-*myc*-mAk 9E10 (IC Chemikalien, Ismaning, Deutschland) selektiert.

Zur Expression der bivalenten bzw. tetravalenten F_v-Antikörper-Konstrukte wurden die Klone in YPD-Medium in Schüttelkolben 2 Tage bei 30°C unter Rühren gezüchtet. Die Zellen wurden zentrifugiert, in dem gleichen Volumen des Mediums, das Methanol enthielt, resuspendiert und weitere 3 Tage bei 30°C unter Rühren inkubiert. Die Überstände wurden nach der Zentrifugation gewonnen. Das rekombinante Produkt wurde durch Ammoniumsulfatfällung, gefolgt von IMAC, wie vorstehend beschrieben, isoliert.

Beispiel 5: Charakterisierung des tetravalenten bzw. bivalenten F_v-Antikörper-Konstruktes

(A) Größenausschlußchromatographie

Eine analytische Gelfiltration der F_v-Antikörper-Konstrukte wurde in PBS unter Verwendung einer Superdex-200-HR10/30-Säule (Pharmacia) durchgeführt. Das

Probenvolumen und die Fließgeschwindigkeit betrugen 200 μ l/min bzw. 0,5 ml/min. Die Säule wurde mit hoch- und niedermolekularen Gelfiltrations-Kalibrationskits (Pharmacia) kalibriert.

(B) Durchflußzytometrie

Die menschliche CD3⁺/CD19⁻-akute-T-Zell-Leukämielinie Jurkat und die CD19⁺/CD3⁻-B-Zelllinie JOK-1 wurden für die Durchflußzytometrie verwendet. 5×10^5 Zellen in 50 μ l RPMI 1640-Medium (GIBCO BRL, Eggestein, Deutschland), das mit 10% FCS und 0,1% Natriumazid supplementiert war (als vollständiges Medium bezeichnet), wurden mit 100 μ l der F_v-Antikörper-Präparate 45 min auf Eis inkubiert. Nach Waschen mit dem vollständigen Medium wurden die Zellen mit 100 μ l 10 μ g/ml anti-c-*myc*-Mak 9E10 (IC Chemikalien) in dem gleichen Puffer 45 min auf Eis inkubiert. Nach einem zweiten Waschzyklus wurden die Zellen mit 100 μ l des FITC-markierten Ziege-anti-Maus-IgG (GIBCO BRL) unter den gleichen Bedingungen wie vorher inkubiert. Die Zellen wurden dann erneut gewaschen und in 100 μ l 1 μ g/ml Propidiumiodid-Lösung (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) in vollständigem Medium unter Ausschluß von toten Zellen resuspendiert. Die relative Fluoreszenz der gefärbten Zellen wurde unter Verwendung eines FACScan-Durchflußzytometers (Becton Dickinson, Mountain View, CA) gemessen.

(C) Cytotoxizitätstest

Die CD19-exprimierende Burkitt-Lymphoma-Zelllinie Raji und Namalwa wurden als Zielzellen verwendet. Die Zellen wurden in RPMI 1640 (GIBCO BRL), das mit 10% hitzeinaktiviertem FCS (GIBCO BRL), 2 mM Glutamin und 1 mM Pyruvat supplementiert war, bei 37°C in einer befeuchteten Atmosphäre mit 7,5% CO₂ inkubiert. Die cytotoxischen T-Zell-Tests wurden in RPMI-1640-Medium, das mit 10% FCS, 10 mM HEPES, 2 mM Glutamin, 1 mM Pyruvat und 0,05 mM 2-ME supplementiert war, durchgeführt. Die cytotoxische Aktivität wurde unter Verwendung eines Standard [⁵¹Cr]-Freisetzungstests bewertet; 2×10^6 Zielzellen wurden mit 200 μ Ci

Na^[51Cr]O₄ (Amersham-Buchler, Braunschweig, Deutschland) markiert und 4mal gewaschen und anschließend in Medium in einer Konzentration von 2×10^5 /ml resuspendiert. Die Effektorzellen wurden auf eine Konzentration von 5×10^6 /ml eingestellt. Zunehmende Mengen an CTLs in 100 μ l wurden auf 10^4 Zielzellen/Vertiefung in 50 μ l titriert. 50 μ l Antikörper wurden jeder Vertiefung zugesetzt. Der gesamte Test wurde dreifach angesetzt und 4 h bei 37°C inkubiert. 100 μ l des Überstands wurden gewonnen und auf [^{51Cr}]-Freisetzung in einem gamma-Zähler (Cobra Auto Gamma; Canberra Packard, Dreieich, Deutschland) getestet. Die maximale Freisetzung wurde durch Inkubation der Zielzellen in 10% SDS bestimmt, und die spontane Freisetzung wurde durch Inkubation der Zellen in Medium allein bestimmt. Die spezifische Lyse (%) wurde berechnet als: (experimentelle Freisetzung - spontane Freisetzung)/(maximale Freisetzung - spontane Freisetzung) x 100.

Beispiel 6: Konstruktion der Plasmide pDISC5-LL und pDISC6-SL zur Expression von bivalenten, bispezifischen bzw. tetravalenten, bispezifischen F_v-Antikörper-Konstrukten in Bakterien durch Hoch-Zelldichte-Fermentation

Es wurden Expressionsvektoren hergestellt, die das hok/sok Plasmid-freie Zell-"suicide"-System und ein Gen enthielten, das für den Skp/OmpH periplasmatischen Faktor für eine größere Herstellung rekombinanter Antikörper kodiert. Das skp Gen wurde durch PCR mittels der Primer skp-1, 5'-CGA ATT CTT AAG ATA AGA AGG AGT TTA TTG TGA AAA AGT GGT TAT TAG CTG CAG G und skp-2, 5'-CGA ATT AAG CTT CAT TAT TTA ACC TGT TTC AGT ACG TCG G unter Verwendung des Plasmids pGAH317 (Holck and Kleppe, 1988, Gene 67, 117-124) amplifiziert. Das erhaltene PCR-Fragment wurde mit AflIII und HindIII gespalten und in das mit AflIII/HindIII linearisierte Plasmid pHKK (Horn et al., 1996, Appl. Microbiol. Biotechnol. 46, 524-532) inseriert, wodurch der Vektor pSKK erhalten wurde. Die in den Plasmiden pDISC3x19-LL und pDISC3x19-SL enthaltenen und für die scFv-Antikörper-Konstrukte kodierenden Gene wurden durch PCR mittels der Primer fe-

1, 5'-CGA ATT TCT AGA TAA GAA GGA GAA ATT AAC CAT GAA ATA CC und fe-
2, 5'-CGA ATT CTT AAG CTA TTA GTG ATG GTG ATG GTG ATG TGA G
amplifiziert. Die XbaI/AflII gespaltenen PCR-Fragmente wurden in pSKK vor dem
skp Insert inseriert, wodurch die Expressionsplasmide pDISC5-LL bzw. pDISC6-SL
5 erhalten wurden, die tri-cistronische Operons unter der Kontrolle des lac
Promotor/Operator-Systems enthalten (vgl. Fig. 9, 10).

K 2675

Patentansprüche

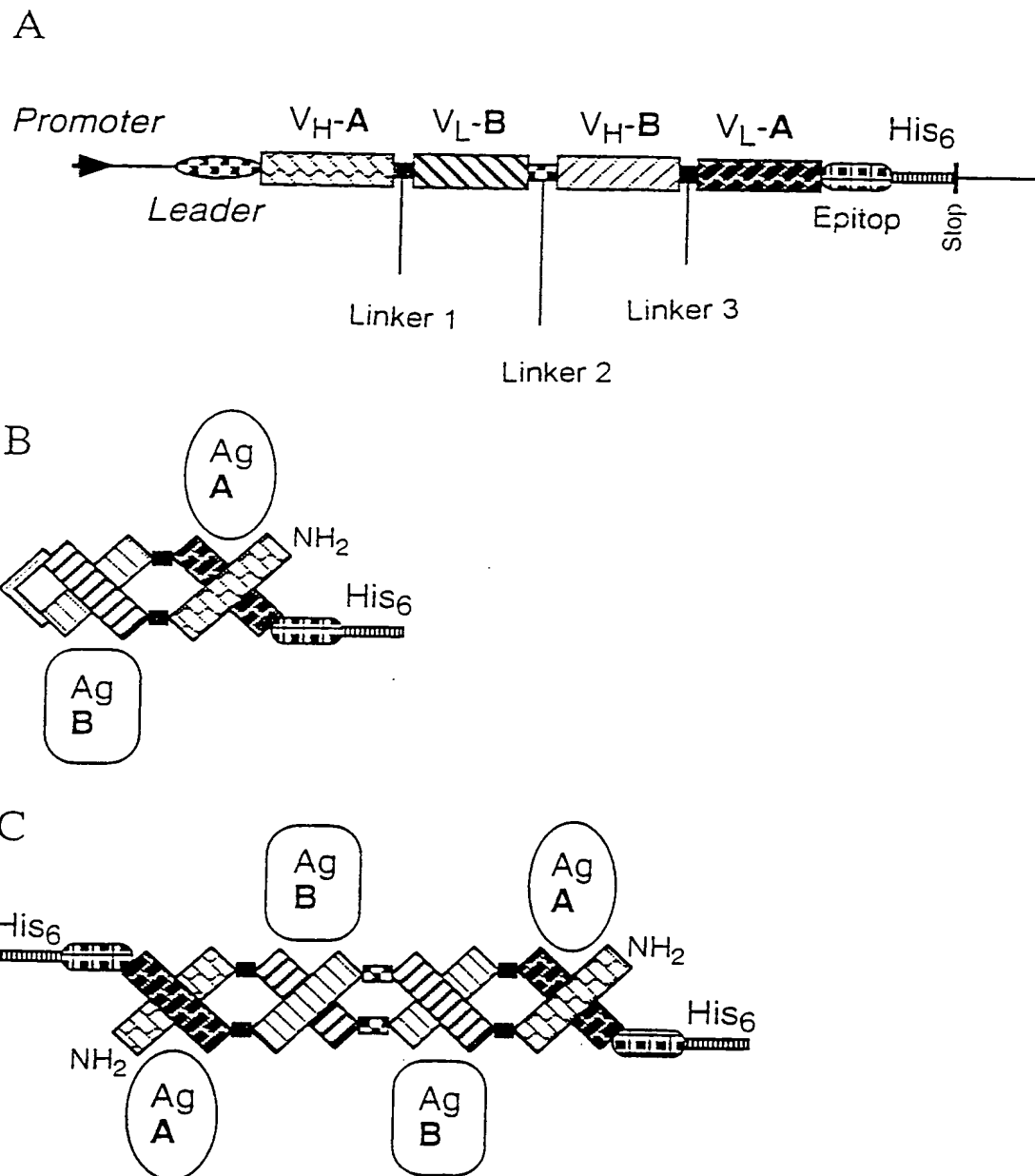
- 5 1. Multivalentes F_v-Antikörper-Konstrukt mit mindestens vier variablen Domänen, die über die Peptidlinker 1, 2 und 3 miteinander verbunden sind.
2. F_v-Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 1, wobei die Peptidlinker 1 und 3 0 -
10 10 Aminosäuren aufweisen.
3. F_v-Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 2, wobei die Peptidlinker 1 und 3 die
 Aminosäuresequenz GG aufweisen.
- 15 4. F_v-Antikörper-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1-3, wobei das F_v-Antikörper-Konstrukt bivalent ist.
5. F_v-Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 4, wobei der Peptidlinker 2 11-20
 Aminosäuren aufweist.
- 20 6. F_v-Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 4 oder 5, wobei der Peptidlinker 2
 die Aminosäuresequenz (G₄S)₄ aufweist.
7. F_v-Antikörper-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1-3, wobei das F_v-Antikörper-Konstrukt tetravalent ist.
- 25 8. F_v-Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 7, wobei der Peptidlinker 2 3-10
 Aminosäuren aufweist.
- 30 9. F_v-Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 7 oder 8, wobei der Peptidlinker 2
 die Aminosäuresequenz GGPGS aufweist.

10. F_v-Antikörper-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1-9, wobei das F_v-Antikörper-Konstrukt multispezifisch ist.
- 5 11. F_v-Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 10, wobei das F_v-Antikörper-Konstrukt bispezifisch ist.
12. F_v-Antikörper-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1-9, wobei das F_v-Antikörper-Konstrukt monospezifisch ist.
- 10 13. Verfahren zur Herstellung des multivalenten F_v-Antikörper-Konstruktes nach einem der Ansprüche 1-12, wobei für die Peptidlinker 1, 2 und 3 kodierende DNAs mit für die vier variablen Domänen eines F_v-Antikörper-Konstruktes kodierenden DNAs ligiert werden derart, daß die Peptidlinker die variablen Domänen miteinander verbinden, und das erhaltene DNA-Molekül in einem
- 15 Expressionsplasmid exprimiert wird.
14. Expressionsplasmid, kodierend für das multivalente F_v-Antikörper-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1-12.
- 20 15. Expressionsplasmid nach Anspruch 14, nämlich pDISC3x19-LL.
16. Expressionsplasmid nach Anspruch 14, nämlich pDISC3x19-SL.
17. Expressionsplasmid nach Anspruch 14, nämlich pPIC-DISC-LL.
- 25 18. Expressionsplasmid nach Anspruch 14, nämlich pPIC-DISC-SL.
19. Expressionsplasmid nach Anspruch 14, nämlich pDISC5-LL.
- 30 20. Expressionsplasmid nach Anspruch 14, nämlich pDISC6-SL.

21. Verwendung des multivalenten F_v-Antikörper-Konstruktes nach einem der Ansprüche 1-12 zur Diagnose und/oder Therapie von Erkrankungen.
22. Verwendung nach Anspruch 21, wobei die Erkrankungen virale, bakterielle oder Tumor-Erkrankungen sind.

5

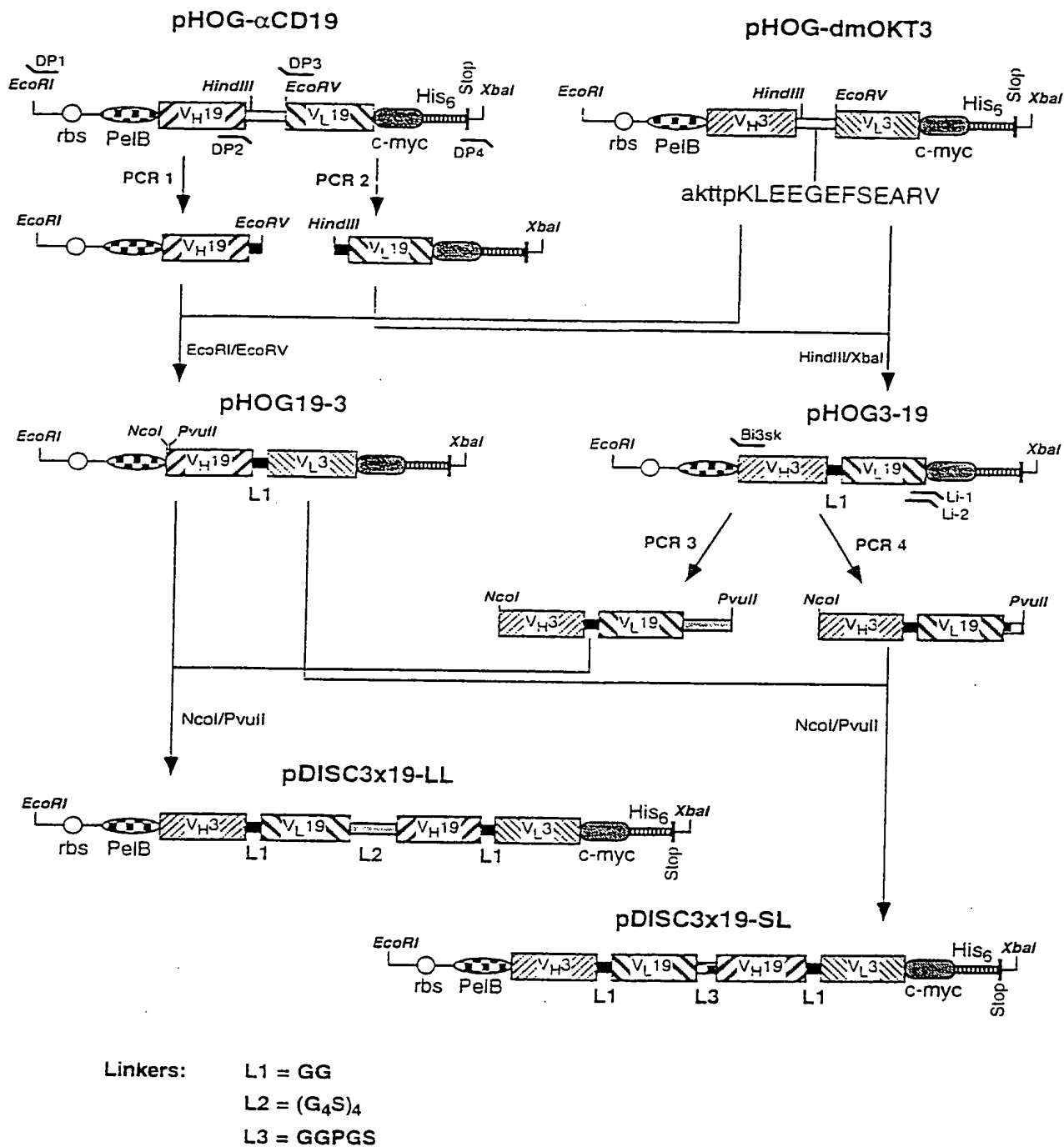
KINSE & CO. GbR & SANK



FIGUR 1

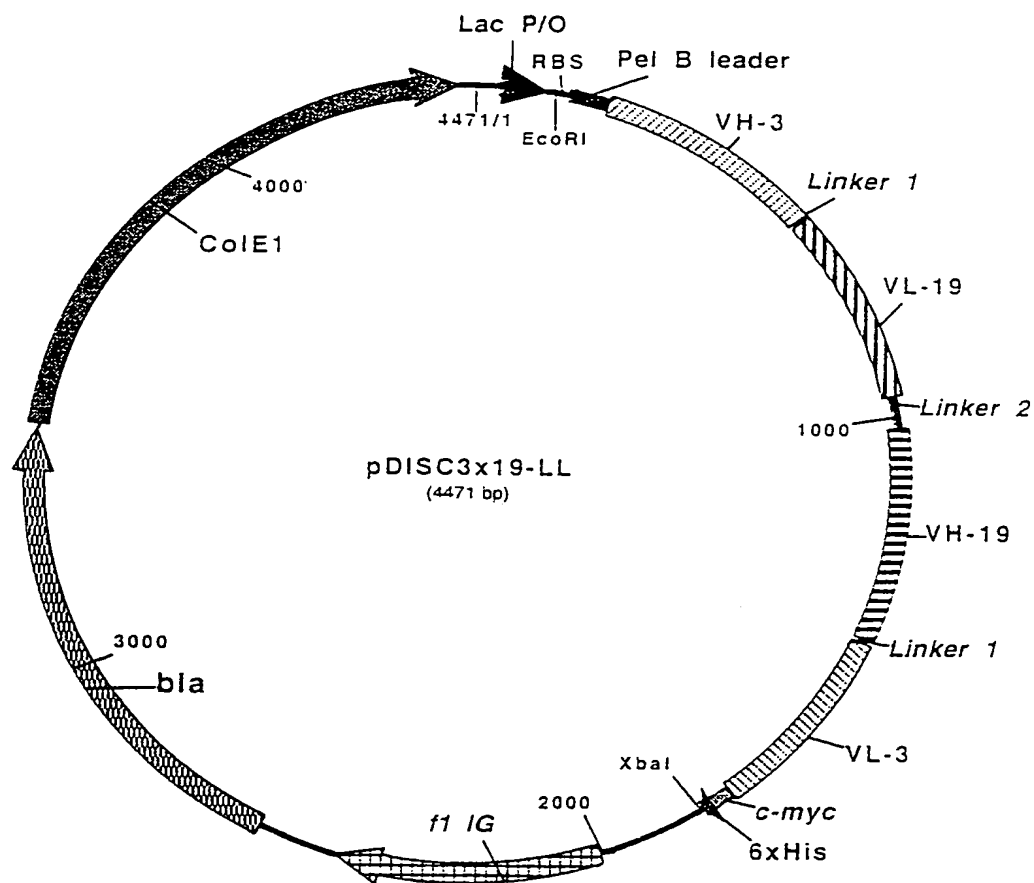
THIS PAGE IS BLANK

2/10



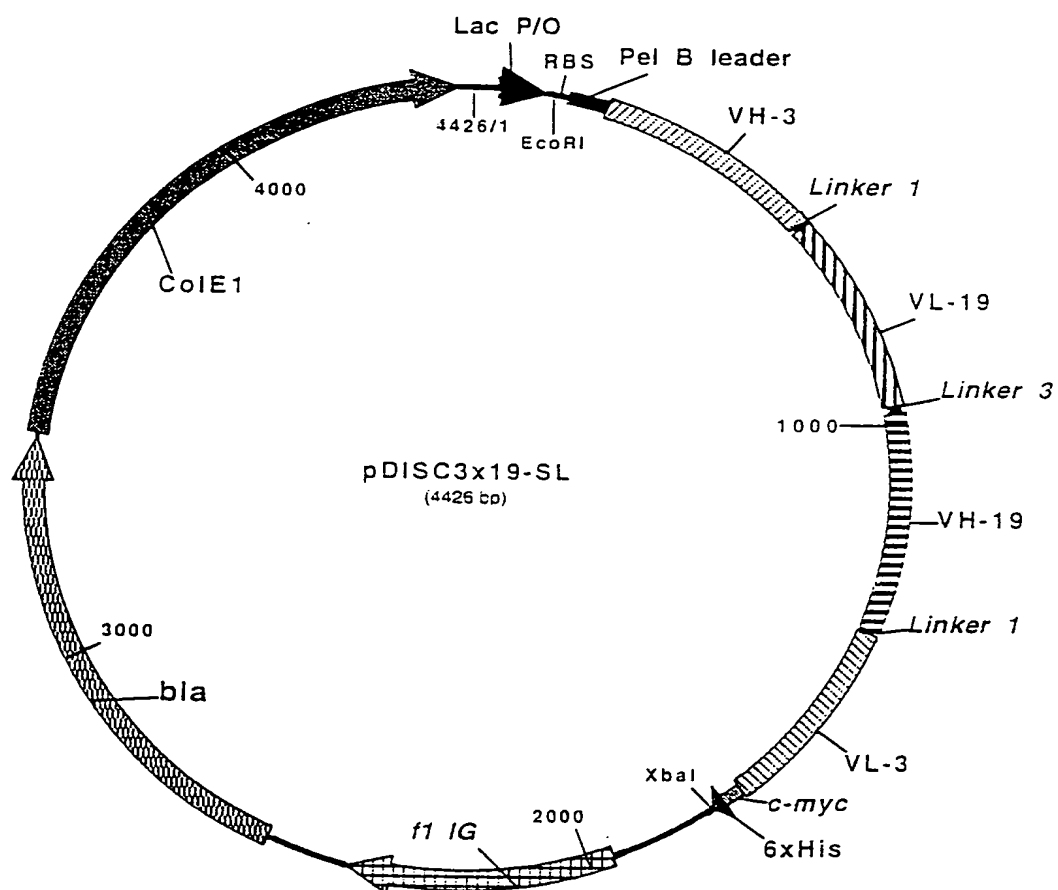
FIGUR 2

THIS PAGE IS BLANK



FIGUR 3

THIS PAGE IS BLANK



FIGUR 4

THIS PAGE IS BLANK

5/10

EcoRI RBS PstI leader NcoI
1 GAATTCATTAAGAGGAGAAATTACCATGAAATACCTATTGCGGTACGGCAGCGCGCTGGGTTGCTGCTGCTGCGCAGCTCAGCGCGCATCG
L M K V L F T A A A G L L L A A Q P A M
Frame-H1 VH anti-CD3
92 CCGAGGTGCAACTGCAGCGCTGCTGGGCTGACTGGCAAGACCTGGGGCGCTCAGTGAAGATGCTCTGCAAGGCTTCTGCTACACCTTAC
22 A Q V Q L Q Q S G A E L A R P G A S V K M S C K A S G Y T F T
CDR-H1 Frame-H2 CDR-H2
183 TAGGTACACGATGCACCTGGGTAAACAGAGCGCTGGACAGGCTGTGGAATGCAATGGATACATTAACTCCTAGCCGTGGTTATAC
52 R Y T M H W V K Q R P G Q G L E W I G Y I N P S R G Y T
Frame-H3
267 TAATTACAATCAGAAGTTCAAGGACAAAGGCCACATTGACTACAGACAAATCTCCAGGCACAGCCTACATGCACTGAGCAGCCTGAC
30 N Y N Q K F K D K A T L T T D K S S S T A Y M Q L S S L T
CDR-H3 Frame-H4
354 ATCTGAGGACTCTGCACTCTATTACTCTGCAAGATATTATGATGATCATTACAGCCTTGACTACTGGGCGCAAGGCACCACTCTCA
109 S E D S A V Y Y C A R Y Y D H Y S L D Y W G Q T T L
CH1 Linker 1 Frame-L1 VL anti-CD19
440 CAGTCTCTCTGCGGCAACCAAGCTTGGCGGTGATATCTTCTGCAACCAACTCCAGCTTCTTGGCTGTCTCTAGGGCAGA
138 T V S S A K T T P K L G G D I L L T Q T P A S L A V S L G Q
CDR-L1 Frame-L2
530 GGGCCACCATCTCTGCAAGGCGCAGCCAAAGTGTTGATTATGATGGTGATAGTTATTTGAACCTGGTACCAACAGTTCCAGGAC
162 R A T I S C K A S L S V D Y D G D S Y L N W Y Q Q I P G
CDR-L2 Frame-L3
514 AGCCACCAACTCTCTCTATGATGCAATCTAGTTCTGCGGATCCCAAGCTTCTAGTGGCAGTGGCTCTGGGACAGACTT
196 Q P P K L L I Y D A S N L V S G I P P R F S G S G S G T D F
CDR-L3 Frame-L4
702 CACCTTCACATCTCTCTGAGAGGCTGGATGCTGCAACCTATCTCTGAGCAAAAGTACTGAGGATCCCTGGACCTTCTGGTGA
225 T L N I H F Y E K V D A A T Y H C Q Q S T E D F W T F G G
C kappa NotI Linker 2
790 GGCACCAAGCTGGAATCAACCGGCTGCTGGCGCGCTGGTGGTGGTGGTTCCTGGCGGGCGGTGGTAGCGGTGGTGGCGGC
255 G T K L E I K R A D A A A A G G G G S G G G G S G G G G
PvuII Frame-H1 VH anti-CD19
874 TCCGGTGGTGGTGGTAGCCAGGTGCACTGCAAGCAGTCTGGGGCTGAGTGGTGAAGCTGGCTCTCAGTGAAGATTCTGCAAGG
283 S G G G G S Q V Q L Q Q S G A E L V R P G S S V K I S C X
CDR-H1 Frame-H2 CDR-H2
962 CTTCTGCTATGCAATCAGTACTGCACTGGAATGAATCGGCTGAAGCAGGCGCTGGACAGGCTCTGAGTGGATTGCAAGATTGGC
312 A S G Y A F S S Y W M N W V K Q R P G Q G L E W I G Q I W
PstI Frame-H3
1049 CTGGAGATGGTGATACCTAATACTGGAAGTTCAAGGGTAAAGCCACTCTGACTGCAGACGAATCTCCAGCAGCCTACA
341 P G D G D T N Y N G K F K G K A T L T A D E S S S T A Y
CDR-H3
1133 TGCACTCAGCAGCCTAGCATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAACACGGGAGACTACGACGGTAGGCCGTTATTACTAT
369 M Q L S S L A S E D S A V Y F C A R R E T T T V G R Y Y Y
Frame-H4 CH1 Linker 1 Frame-L1
1219 GCTATGGACTACTGGGCTCAAGCACTCTGCAACCTCTCTCAGCCCAACCAACCAAGCTTGGCGGTGATATCTGCTCACTC
398 A M D Y W G Q G T S V T V S S A K T T P K L G G D I V L T
VL anti-CD3 CDR-L1
1307 AGTCTCAGCAATCATCTCTGCACTCTGAGGAGAGGTCACCATGACCTGCACTGAGTGGCAGCTCAAGTGTAAGTTACATGAAGTGG
427 Q S P A I M S A S P G E K V T M T C S A S S V S Y M N W
Frame-L2 CDR-L2 Frame-L3
1393 TACCAAGCAGAGTCAGGCACCTCCCGCAAGATGGATTATGACAGATCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCACTTCAGGGCA
456 Y Q Q K S G T S P K R W I Y D T S K L A S G V P A H F R G
CDR-L3
1481 GTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCAATCAGCGGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTAA
485 S G S G T S Y S L T I S G M E A E D A A T Y Y C Q Q W S S N
Frame-L4 C kappa c-myc epitope
1569 CCCATTACAGCTTGGCTCGGGGACAAAGTTGGAATAAACCGGGGCTACTGCACTGGATCCGAACAAAGCTGATCTCAG
514 P F T F G S G T X L E I N R A D T A P T G S E Q K L I S
His6 tail XbaI
1655 AAGAAGACCTAAACTCAGTCACTTCCTTCCTAATCTAGA
543 E E D L N S H H H H H H H

FIGUR 5

THIS PAGE IS BLANK

THIS PAGE IS BLANK

941 ATGAGATTTCCTTCAATTTTACTGCTGTTTTATTCCGAGCATCCTCCGCATTAGCTGCTCCAGTCAACACTAC
1► M R F P S I F T A V L F A A S S A L A A P V N T T

alpha-factor signal

alpha-factor signal

1015 AACGGAAGATGAAPCGGCACAAATTCGGCTGAAGCTGTCATCGGTTACTCAGATTTAGAGGGCGATTTTCGATG
25 T E D E T A Q I P A E A V I G Y S D L E G D F D

1089 TTGCTGTTTTTGCATTTTCCAAACAGCACAAATAACGGGTATTGTTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCT
50▶ V A V L P F S N S T N N G L L F I N T T I A S I A

Xhol

EcoRI

1163 GCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAGAAAAAGAGAGGCTGAAGCTGAATTCCAGGTGCAACTGCAGCAGTC
75▶ A K E E G V S L E K R E A E A E F Q V Q L Q Q S

VH anti-CD3

1234 TGGGGCTGAACTGGCAAGACCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCT
98▶ G A E L A R P G A S V K M S C K A S

FIGUR 7

THIS PAGE IS BLANK

941 ATGAGATTTCTTCAATTTTTACTGCTGTTTTATTTCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGCTCCAGTCAACACTAC
1▶ M R F P S I F T A V L F A A S S A L A A P V N T T

alpha-factor signal

1015 AACAGAAGATGAAACGGCACAAATTCCGGCTGAAGCTGTCATCGGTTACTCAGATTTAGAAGGGGATTTCCATG
25▶ T E D E T A Q I P A E A V I G Y S D L E G D F D

BsrDI

1089 TTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAACGGGTTATTGTTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCT
50▶ V A V L P F S N S T N N G L L F I N T T I A S I A

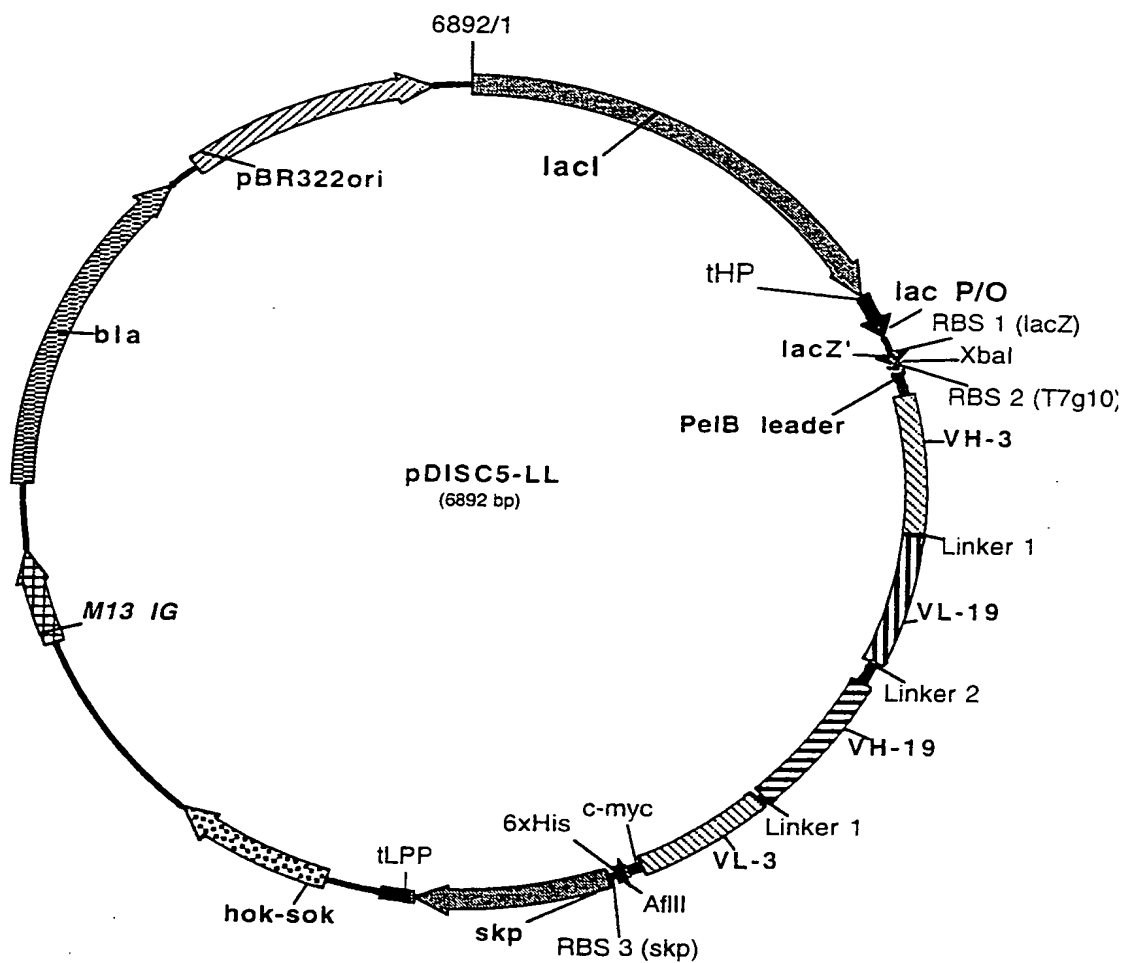
XhoI EcoRI

1163 GCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTCAATTCATGGCGCAGGTGCAACTGCAG
75▶ A K E E G V S L E K R E A E A E F M A Q V Q L Q

VH anti-CD3

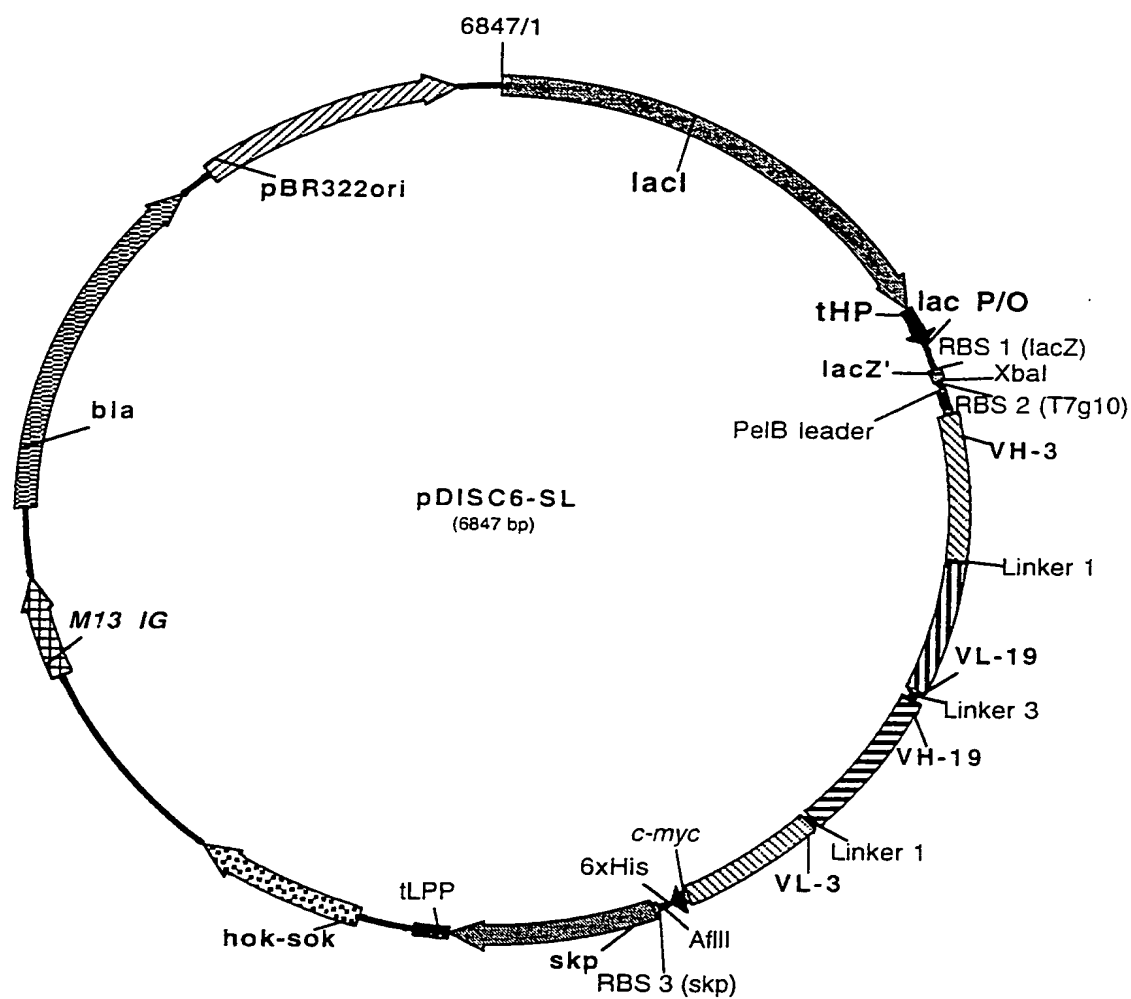
1235 CAGTCTGGGGCTGAACTGGCAAGACCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCT
99▶ Q S G A E L A R P G A S V K M S C K A S

THIS PAGE IS BLANK



FIGUR 9

THIS PAGE IS BLANK



FIGUR 10

THIS PAGE IS BLANK

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Deutsches Krebsforschungszentrum
- (B) STRASSE: Im Neuenheimer Feld 280
- (C) ORT: Heidelberg
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 69120

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Multivalente Antikörper-Konstrukte

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 17

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1698 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 28..1689

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: mat_peptide
- (B) LAGE: 28..1689

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1

GAATTCATTA AAGAGGAGAA ATTAACC ATG AAA TAC CTA TTG CCT ACG GCA
Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala

THIS PAGE IS BLANK

GCC GCT GGC TTG CTG CTG CTG GCA GCT CAG CCG GCC ATG GCG CAG GTG Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val 10 15 20	99
CAA CTG CAG CAG TCT GGG GCT GAA CTG GCA AGA CCT GGG GCC TCA GTG Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val 25 30 35 40	147
AAG ATG TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC ACC TTT ACT AGG TAC ACG ATG Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met 45 50 55	195
CAC TGG GTA AAA CAG AGG CCT GGA CAG GGT CTG GAA TGG ATT GGA TAC His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr 60 65 70	243
ATT AAT CCT AGC CGT GGT TAT ACT AAT TAC AAT CAG AAG TTC AAG GAC Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp 75 80 85	291
AAG GCC ACA TTG ACT ACA GAC AAA TCC TCC AGC ACA GCC TAC ATG CAA Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln 90 95 100	339
CTG AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCA GTC TAT TAC TGT GCA AGA Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg 105 110 115 120	387
TAT TAT GAT GAT CAT TAC AGC CTT GAC TAC TGG GGC CAA GGC ACC ACT Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr 125 130 135	435
CTC ACA GTC TCC TCA GCC AAA ACA ACA CCC AAG CTT GGC GGT GAT ATC Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Gly Gly Asp Ile 140 145 150	483
TTG CTC ACC CAA ACT CCA GCT TCT TTG GCT GTG TCT CTA GGG CAG AGG Leu Leu Thr Gln Thr Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg 155 160 165	531
GCC ACC ATC TCC TGC AAG GCC AGC CAA AGT GTT GAT TAT GAT GGT GAT Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp 170 175 180	579
AGT TAT TTG AAC TGG TAC CAA CAG ATT CCA GGA CAG CCA CCC AAA CTC Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu 185 190 195 200	627
CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAT CTA GTT TCT GGG ATC CCA CCC AGG TTT Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Val Ser Gly Ile Pro Pro Arg Phe 205 210 215	675
AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACC CTC AAC ATC CAT CCT GTG Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His Pro Val 220 225 230	723

THIS PAGE IS BLANK

GAG Glu	AAG Lys	GTG Val	GAT Asp	GCT Ala	GCA Ala	ACC Thr	TAT Tyr	CAC His	TGT Cys	CAG Gln	CAA Gln	AGT Ser	ACT Thr	GAG Glu	GAT Asp	771
		235					240					245				
CCG Pro	TGG Trp	ACG Thr	TTC Phe	GGT Gly	GGA Gly	GGC Gly	ACC Thr	AAG Lys	CTG Leu	GAA Glu	ATC Ile	AAA Lys	CGG Arg	GCT Ala	GAT Asp	819
	250					255					260					
GCT Ala	GCG Ala	GCC Ala	GCT Ala	GGT Gly	GGT Gly	GGT Gly	GGT Gly	TCT Ser	GGC Gly	GGC Gly	GGT Gly	GGT Gly	AGC Ser	GGT Gly	GGT Gly	867
265					270					275					280	
GGC Gly	GGC Gly	TCC Ser	GGT Gly	GGT Gly	GGT Gly	GGT Gly	AGC Ser	CAG Gln	GTG Val	CAG Gln	CTG Leu	CAG Gln	CAG Gln	TCT Ser	GGG Gly	915
				285					290					295		
GCT Ala	GAG Glu	CTG Leu	GTG Val	AGG Arg	CCT Pro	GGG Gly	TCC Ser	TCA Ser	GTG Val	AAG Lys	ATT Ile	TCC Ser	TGC Cys	AAG Lys	GCT Ala	963
			300					305					310			
TCT Ser	GGC Gly	TAT Tyr	GCA Ala	TTC Phe	AGT Ser	AGC Ser	TAC Tyr	TGG Trp	ATG Met	AAC Asn	TGG Trp	GTG Val	AAG Lys	CAG Gln	AGG Arg	1011
		315					320					325				
CCT Pro	GGA Gly	CAG Gln	GGT Gly	CTT Leu	GAG Glu	TGG Trp	ATT Ile	GGA Gly	CAG Gln	ATT Ile	TGG Trp	CCT Pro	GGA Gly	GAT Asp	GGT Gly	1059
	330					335					340					
GAT Asp	ACT Thr	AAC Asn	TAC Tyr	AAT Asn	GGA Gly	AAG Lys	TTC Phe	AAG Lys	GGT Gly	AAA Lys	GCC Ala	ACT Thr	CTG Leu	ACT Thr	GCA Ala	1107
345					350					355					360	
GAC Asp	GAA Glu	TCC Ser	TCC Ser	AGC Ser	ACA Thr	GCC Ala	TAC Tyr	ATG Met	CAA Gln	CTC Leu	AGC Ser	AGC Ser	CTA Leu	GCA Ala	TCT Ser	1155
				365					370					375		
GAG Glu	GAC Asp	TCT Ser	GCG Ala	GTC Val	TAT Tyr	TTC Phe	TGT Cys	GCA Ala	AGA Arg	CGG Arg	GAG Glu	ACT Thr	ACG Thr	ACG Thr	GTA Val	1203
			380					385					390			
GGC Gly	CGT Arg	TAT Tyr	TAC Tyr	TAT Tyr	GCT Ala	ATG Met	GAC Asp	TAC Tyr	TGG Trp	GGT Gly	CAA Gln	GGA Gly	ACC Thr	TCA Ser	GTC Val	1251
	395						400					405				
ACC Thr	GTC Val	TCC Ser	TCA Ser	GCC Ala	AAA Lys	ACA Thr	ACA Thr	CCC Pro	AAG Lys	CTT Leu	GGC Gly	GGT Gly	GAT Asp	ATC Ile	GTG Val	1299
	410					415					420					
CTC Leu	ACT Thr	CAG Gln	TCT Ser	CCA Pro	GCA Ala	ATC Ile	ATG Met	TCT Ser	GCA Ala	TCT Ser	CCA Pro	GGG Gly	GAG Glu	AAG Lys	GTC Val	1347
425					430					435					440	
ACC Thr	ATG Met	ACC Thr	TGC Cys	AGT Ser	GCC Ala	AGC Ser	TCA Ser	AGT Ser	GTA Val	AGT Ser	TAC Tyr	ATG Met	AAC Asn	TGG Trp	TAC Tyr	1395
				445					450					455		

THIS PAGE IS BLANK

CAG CAG AAG TCA GGC ACC TCC CCC AAA AGA TGG ATT TAT GAC ACA TCC Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser 460 465 470	1443
AAA CTG GCT TCT GGA GTC CCT GCT CAC TTC AGG GGC AGT GGG TCT GGG Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His Phe Arg Gly Ser Gly Ser Gly 475 480 485	1491
ACC TCT TAC TCT CTC ACA ATC AGC GGC ATG GAG GCT GAA GAT GCT GCC Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala 490 495 500	1539
ACT TAT TAC TGC CAG CAG TGG AGT AGT AAC CCA TTC ACG TTC GGC TCG Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Ser 505 510 515 520	1587
GGG ACA AAG TTG GAA ATA AAC CGG GCT GAT ACT GCA CCA ACT GGA TCC Gly Thr Lys Leu Ile Asn Arg Ala Asp Thr Ala Pro Thr Gly Ser 525 530 535	1635
GAA CAA AAG CTG ATC TCA GAA GAA GAC CTA AAC TCA CAT CAC CAT CAC Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser His His His His 540 545 550	1683
CAT CAC TAATCTAGA His His	1698

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 554 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala 1 5 10 15
Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu 20 25 30
Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly 35 40 45
Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly 50 55 60
Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr 65 70 75 80

THIS PAGE IS BLANK

THIS PAGE IS BLANK

Met Gln Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 370 375 380
 Ala Arg Arg Glu Thr Thr Thr Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp
 385 390 395 400
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr
 405 410 415
 Pro Lys Leu Gly Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met
 420 425 430
 Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser
 435 440 445
 Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro
 450 455 460
 Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala
 465 470 475 480
 His Phe Arg Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser
 485 490 495
 Gly Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser
 500 505 510
 Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Arg
 515 520 525
 Ala Asp Thr Ala Pro Thr Gly Ser Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu
 530 535 540
 Asp Leu Asn Ser His His His His His
 545 550

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1653 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 28..1644

THIS PAGE IS BLANK

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: mat_peptide

(B) LAGE:28..1644

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

GAATTCATTA AAGAGGAGAA ATTAACC ATG AAA TAC CTA TTG CCT ACG GCA	51
Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala	
1 5	
GCC GCT GGC TTG CTG CTG CTG GCA GCT CAG CCG GCC ATG GCG CAG GTG	99
Ala Ala Gly Leu Leu Leu Ala Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val	
10 15 20	
CAA CTG CAG CAG TCT GGG GCT GAA CTG GCA AGA CCT GGG GCC TCA GTG	147
Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val	
25 30 35 40	
AAG ATG TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC ACC TTT ACT AGG TAC ACG ATG	195
Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met	
45 50 55	
CAC TGG GTA AAA CAG AGG CCT GGA CAG GGT CTG GAA TGG ATT GGA TAC	243
His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr	
60 65 70	
ATT AAT CCT AGC CGT GGT TAT ACT AAT TAC AAT CAG AAG TTC AAG GAC	291
Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp	
75 80 85	
AAG GCC ACA TTG ACT ACA GAC AAA TCC TCC AGC ACA GCC TAC ATG CAA	339
Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln	
90 95 100	
CTG AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCA GTC TAT TAC TGT GCA AGA	387
Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg	
105 110 115 120	
TAT TAT GAT GAT CAT TAC AGC CTT GAC TAC TGG GGC CAA GGC ACC ACT	435
Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr	
125 130 135	
CTC ACA GTC TCC TCA GCC AAA ACA ACA CCC AAG CTT GGC GGT GAT ATC	483
Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Gly Gly Asp Ile	
140 145 150	
TTG CTC ACC CAA ACT CCA GCT TCT TTG GCT GTG TCT CTA GGG CAG AGG	531
Leu Leu Thr Gln Thr Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg	
155 160 165	
GCC ACC ATC TCC TGC AAG GCC AGC CAA AGT GTT GAT TAT GAT GGT GAT	579
Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp	
170 175 180	

THIS PAGE IS BLANK

AGT Ser 185	TAT Tyr	TTG Leu	AAC Asn	TGG Trp	TAC Tyr	CAA Gln	CAG Gln	ATT Ile	CCA Pro	GGA Gly	CAG Gln	CCA Pro	CCC Pro	AAA Lys	CTC Leu	627
CTC Leu	ATC Ile	TAT Tyr	GAT Asp	GCA Ala	TCC Ser	AAT Asn	CTA Leu	GTT Val	TCT Ser	GGG Gly	ATC Ile	CCA Pro	CCC Pro	AGG Arg	TTT Phe	675
AGT Ser	GGC Gly	AGT Ser	GGG Gly	TCT Ser	GGG Gly	ACA Thr	GAC Asp	TTC Phe	ACC Thr	CTC Leu	AAC Asn	ATC Ile	CAT His	CCT Pro	GTG Val	723
GAG Glu	AAG Lys	GTG Val	GAT Asp	GCT Ala	GCA Ala	ACC Thr	TAT Tyr	CAC His	TGT Cys	CAG Gln	CAA Gln	AGT Ser	ACT Thr	GAG Glu	GAT Asp	771
CCG Pro	TGG Trp	ACG Thr	TTC Phe	GGT Gly	GGA Gly	GGC Gly	ACC Thr	AAG Lys	CTG Leu	GAA Glu	ATC Ile	AAA Lys	CGG Arg	GCT Ala	GAT Asp	819
GCT Ala	GCG Ala	GCC Ala	GCT Ala	GGT Gly	GGC Gly	CCA Pro	GGG Gly	TCG Ser	CAG Gln	GTG Val	CAG Gln	CTG Leu	CAG Gln	CAG Gln	TCT Ser	867
GGG Gly	GCT Ala	GAG Glu	CTG Leu	GTG Val	AGG Arg	CCT Pro	GGG Gly	TCC Ser	TCA Ser	GTG Val	AAG Lys	ATT Ile	TCC Ser	TGC Cys	AAG Lys	915
GCT Ala	TCT Ser	GGC Gly	TAT Tyr	GCA Ala	TTC Phe	AGT Ser	AGC Ser	TAC Tyr	TGG Trp	ATG Met	AAC Asn	TGG Trp	GTG Val	AAG Lys	CAG Gln	963
AGG Arg	CCT Pro	GGA Gly	CAG Gln	GGT Gly	CTT Leu	GAG Glu	TGG Trp	ATT Ile	GGA Gly	CAG Gln	ATT Ile	TGG Trp	CCT Pro	GGA Gly	GAT Asp	1011
GGT Gly	GAT Asp	ACT Thr	AAC Asn	TAC Tyr	AAT Asn	GGA Gly	AAG Lys	TTC Phe	AAG Lys	GGT Gly	AAA Lys	GCC Ala	ACT Thr	CTG Leu	ACT Thr	1059
GCA Ala	GAC Asp	GAA Glu	TCC Ser	TCC Ser	AGC Ser	ACA Thr	GCC Ala	TAC Tyr	ATG Met	CAA Gln	CTC Leu	AGC Ser	AGC Ser	CTA Leu	GCA Ala	1107
TCT Ser	GAG Glu	GAC Asp	TCT Ser	GCG Ala	GTC Val	TAT Tyr	TTC Phe	TGT Cys	GCA Ala	AGA Arg	CGG Arg	GAG Glu	ACT Thr	ACG Thr	ACG Thr	1155
GTA Val	GGC Gly	CGT Arg	TAT Tyr	TAC Tyr	TAT Tyr	GCT Ala	ATG Met	GAC Asp	TAC Tyr	TGG Trp	GGT Gly	CAA Gln	GGA Gly	ACC Thr	TCA Ser	1203
GTC Val	ACC Thr	GTC Val	TCC Ser	TCA Ser	GCC Ala	AAA Lys	ACA Thr	ACA Thr	CCC Pro	AAG Lys	CTT Leu	GGC Gly	GGT Gly	GAT Asp	ATC Ile	1251

THIS PAGE IS BLANK

GTG	CTC	ACT	CAG	TCT	CCA	GCA	ATC	ATG	TCT	GCA	TCT	CCA	GGG	GAG	AAG	1299
Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ile	Met	Ser	Ala	Ser	Pro	Gly	Glu	Lys	
410						415					420					
GTC	ACC	ATG	ACC	TGC	AGT	GCC	AGC	TCA	AGT	GTA	AGT	TAC	ATG	AAC	TGG	1347
Val	Thr	Met	Thr	Cys	Ser	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Met	Asn	Trp	
425					430					435					440	
TAC	CAG	CAG	AAG	TCA	GGC	ACC	TCC	CCC	AAA	AGA	TGG	ATT	TAT	GAC	ACA	1395
Tyr	Gln	Gln	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Pro	Lys	Arg	Trp	Ile	Tyr	Asp	Thr	
				445					450					455		
TCC	AAA	CTG	GCT	TCT	GGA	GTC	CCT	GCT	CAC	TTC	AGG	GGC	AGT	GGG	TCT	1443
Ser	Lys	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ala	His	Phe	Arg	Gly	Ser	Gly	Ser	
			460					465						470		
GGG	ACC	TCT	TAC	TCT	CTC	ACA	ATC	AGC	GGC	ATG	GAG	GCT	GAA	GAT	GCT	1491
Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Gly	Met	Glu	Ala	Glu	Asp	Ala	
			475				480						485			
GCC	ACT	TAT	TAC	TGC	CAG	CAG	TGG	AGT	AGT	AAC	CCA	TTC	ACG	TTC	GGC	1539
Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Trp	Ser	Ser	Asn	Pro	Phe	Thr	Phe	Gly	
	490					495					500					
TCG	GGG	ACA	AAG	TTG	GAA	ATA	AAC	CGG	GCT	GAT	ACT	GCA	CCA	ACT	GGA	1587
Ser	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Asn	Arg	Ala	Asp	Thr	Ala	Pro	Thr	Gly	
505					510					515					520	
TCC	GAA	CAA	AAG	CTG	ATC	TCA	GAA	GAA	GAC	CTA	AAC	TCA	CAT	CAC	CAT	1635
Ser	Glu	Gln	Lys	Leu	Ile	Ser	Glu	Glu	Asp	Leu	Asn	Ser	His	His	His	
				525					530					535		
CAC	CAT	CAC	TAATCTAGA													1653
His	His	His														

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 539 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
 1 5 10 15

Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu
 20 25 30

Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly
 35 40 45

THIS PAGE IS BLANK

10

Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly
 50 55 60
 Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr
 65 70 75 80
 Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys
 85 90 95
 Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp
 100 105 110
 Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Ser Leu
 115 120 125
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr
 130 135 140
 Thr Pro Lys Leu Gly Gly Asp Ile Leu Leu Thr Gln Thr Pro Ala Ser
 145 150 155 160
 Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser
 165 170 175
 Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln
 180 185 190
 Ile Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu
 195 200 205
 Val Ser Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 210 215 220
 Phe Thr Leu Asn Ile His Pro Val Glu Lys Val Asp Ala Ala Thr Tyr
 225 230 235 240
 His Cys Gln Gln Ser Thr Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr
 245 250 255
 Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Ala Gly Gly Pro Gly
 260 265 270
 Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly
 275 280 285
 Ser Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser
 290 295 300
 Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
 305 310 315 320
 Ile Gly Gln Ile Trp Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys
 325 330 335

THIS PAGE IS BLANK

Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Ser Ser Thr Ala
 340 345 350
 Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe
 355 360 365
 Cys Ala Arg Arg Glu Thr Thr Thr Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met
 370 375 380
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr
 385 390 395 400
 Thr Pro Lys Leu Gly Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile
 405 410 415
 Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser
 420 425 430
 Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser
 435 440 445
 Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro
 450 455 460
 Ala His Phe Arg Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
 465 470 475 480
 Ser Gly Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
 485 490 495
 Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn
 500 505 510
 Arg Ala Asp Thr Ala Pro Thr Gly Ser Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu
 515 520 525
 Glu Asp Leu Asn Ser His His His His His
 530 535

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 57 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

THIS PAGE IS BLANK

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

TATATACTGC AGCTGCACCT GCGACCCTGG GCCACCAGCG GCCGCAGCAT CAGCCCG

57

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 45 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

CCGTGAATTC CAGGTGCAAC TGCAGCAGTC TGGGGCTGAA CTGGC

45

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 34 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

GGTCGACGTT AACCGACAAA CAACAGATAA AACG

34

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 348 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang

THIS PAGE IS BLANK

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LAGE:1..348

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: mat_peptide

(B) LAGE:1..348

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

ATG AGA TTT CCT TCA ATT TTT ACT GCT GTT TTA TTC GCA GCA TCC TCC	48
Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser	
1 5 10 15	
GCA TTA GCT GCT CCA GTC AAC ACT ACA ACA GAA GAT GAA ACG GCA CAA	96
Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln	
20 25 30	
ATT CCG GCT GAA GCT GTC ATC GGT TAC TCA GAT TTA GAA GGG GAT TTC	144
Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe	
35 40 45	
GAT GTT GCT GTT TTG CCA TTT TCC AAC AGC ACA AAT AAC GGG TTA TTG	192
Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu	
50 55 60	
TTT ATA AAT ACT ACT ATT GCC AGC ATT GCT GCT AAA GAA GAA GGG GTA	240
Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val	
65 70 75 80	
TCT CTC GAG AAA AGA GAG GCT GAA GCT GAA TTC CAG GTG CAA CTG CAG	288
Ser Leu Glu Lys Arg Glu Ala Glu Ala Glu Phe Gln Val Gln Leu Gln	
85 90 95	
CAG TCT GGG GCT GAA CTG GCA AGA CCT GGG GCC TCA GTG AAG ATG TCC	336
Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser	
100 105 110	
TGC AAG GCT TCT	348
Cys Lys Ala Ser	
115	

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

THIS PAGE IS BLANK

14

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 116 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

```

Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser
 1           5           10           15
Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln
          20           25           30
Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe
          35           40           45
Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu
          50           55           60
Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val
          65           70           75           80
Ser Leu Glu Lys Arg Glu Ala Glu Ala Glu Phe Gln Val Gln Leu Gln
          85           90           95
Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser
          100          105          110
Cys Lys Ala Ser
          115

```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 354 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 1..354

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: mat_peptide
- (B) LAGE: 1..354

THIS PAGE IS BLANK

15

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

ATG AGA TTT CCT TCA ATT TTT ACT GCT GTT TTA TTC GCA GCA TCC TCC	48
Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser	
1 5 10 15	
GCA TTA GCT GCT CCA GTC AAC ACT ACA ACA GAA GAT GAA ACG GCA CAA	96
Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln	
20 25 30	
ATT CCG GCT GAA GCT GTC ATC GGT TAC TCA GAT TTA GAA GGG GAT TTC	144
Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe	
35 40 45	
GAT GTT GCT GTT TTG CCA TTT TCC AAC AGC ACA AAT AAC GGG TTA TTG	192
Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu	
50 55 60	
TTT ATA AAT ACT ACT ATT GCC AGC ATT GCT GCT AAA GAA GAA GGG GTA	240
Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val	
65 70 75 80	
TCT CTC GAG AAA AGA GAG GCT GAA GCT GAA TTC ATG GCG CAG GTG CAA	288
Ser Leu Glu Lys Arg Glu Ala Glu Ala Phe Met Ala Gln Val Gln	
85 90 95	
CTG CAG CAG TCT GGG GCT GAA CTG GCA AGA CCT GGG GCC TCA GTG AAG	336
Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys	
100 105 110	
ATG TCC TGC AAG GCT TCT	354
Met Ser Cys Lys Ala Ser	
115	

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN: :

(A) LÄNGE: 118 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser
1 5 10 15
Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln
20 25 30
Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe
35 40 45

THIS PAGE IS BLANK

16

Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu
 50 55 60
 Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val
 65 70 75 80
 Ser Leu Glu Lys Arg Glu Ala Glu Ala Glu Phe Met Ala Gln Val Gln
 85 90 95
 Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys
 100 105 110
 Met Ser Cys Lys Ala Ser
 115

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 42 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
 - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

TCACACAGAA TTCTTAGATC TATTAAAGAG GAGAAATTAA CC

42

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 40 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
 - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: NEIN

THIS PAGE IS BLANK

17

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

AGCACACGAT ATCACCGCCA AGCTTGGGTG TTGTTTTGGC

40

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 43 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

AGCACACAAG CTTGGCGGTG ATATCTTGCT CACCCAAACT CCA

43

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 15:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 57 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:

AGCACACTCT AGAGACACAC AGATCTTTAG TGATGGTGAT GGTGATGTGA GTTTAGG

57

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 16:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 33 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

THIS PAGE IS BLANK

18

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
 - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16:

CAGCCGGCCA TGGCGCAGGT GCAACTGCAG CAG

33

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 17:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 102 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
 - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "Primer"
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 17:

TATATACTGC AGCTGCACCT GGCTACCACC ACCACCGGAG CCGCCACCAC CGCTACCACC

60

GCCGCCAGAA CCACCACCAC CAGCGGCCGC AGCATCAGCC CG

102

THIS PAGE IS BLANK

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C07K 16/00 16/28, C12N 15/63, A61K 39/395, G01N 33/53		A3	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/57150
		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:	11. November 1999 (11.11.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE99/01350		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 5. Mai 1999 (05.05.99)			
(30) Prioritätsdaten: 198 19 846.9 5. Mai 1998 (05.05.98) DE			
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS [DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 280, D-69120 Heidelberg (DE).			
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LITTLE, Melvyn [GB/DE]; Fritz-von-Briesen-Strasse 10, D-69151 Neckargemünd (DE). KIPRIYANOV, Sergej [RU/DE]; Furtwänglerstrasse 3, D-69121 Heidelberg (DE).		Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht.	
(74) Anwalt: HUBER, Bernard; Huber & Schüssler, Truderinger Strasse 246, D-81825 München (DE).		(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 22. Juni 2000 (22.06.00)	

(54) Title: MULTIVALENT ANTIBODY CONSTRUCTS

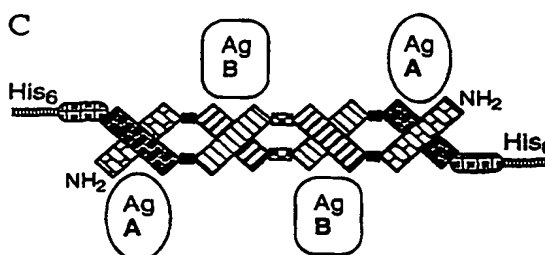
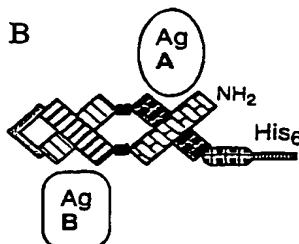
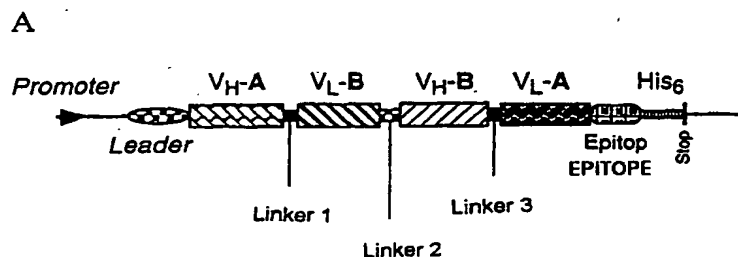
(54) Bezeichnung: MULTIVALENTE ANTIKÖRPER-KONSTRUKTE

(57) Abstract

The invention relates to a multivalent F_v antibody construct comprising at least four variable domains which are connected to one another via peptide linkers 1, 2 and 3. The invention also relates to expression plasmids which code for such an F_v antibody construct. In addition, the invention relates to a method for producing the F_v antibody constructs and to the use thereof.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein multivalentes F_v-Antikörper-Konstrukt mit mindestens vier variablen Domänen, die über die Peptidlinker 1, 2 und 3 miteinander verbunden sind. Ferner betrifft die Erfindung Expressionsplasmide, die für ein solches F_v-Antikörper-Konstrukt codieren, und ein Verfahren zur Herstellung der F_v-Antikörper-Konstrukte sowie deren Verwendung.



LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. Application No

PCT/DE 99/01350

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C07K16/00 C07K16/28 C12N15/63 A61K39/395 G01N33/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K C07K G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GRUBER M ET AL: "Efficient tumor cell lysis mediated by a bispecific single chain antibody expressed in Escherichia coli." JOURNAL OF IMMUNOLOGY, (1994 JUN 1) 152 (11) 5368-74. , XP000872832 the whole document	1,4, 10-14, 21,22
X	MACK M ET AL: "A small bispecific antibody construct expressed as a functional single-chain molecule with high tumor cell cytotoxicity." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, (1995 JUL 18) 92 (15) 7021-5. , XP000566333 the whole document	1,2,4, 10-14, 21,22

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 February 2000

Date of mailing of the international search report

17.03.00

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mennessier, T

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. Appl. No.

PCT/DE 99/01350

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>KURUCZ I ET AL: "Retargeting of CTL by an efficiently refolded bispecific single-chain Fv dimer produced in bacteria." JOURNAL OF IMMUNOLOGY, (1995 MAY 1) 154 (9) 4576-82. , XP000872833 the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1,4,5, 10-14, 21,22
X	<p>DE JONGE J ET AL: "Production and characterization of bispecific single-chain antibody fragments." MOLECULAR IMMUNOLOGY, (1995 DEC) 32 (17-18) 1405-12. , XP000872314 the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1,4,5, 10-14, 21,22
A	<p>COLOMA M J ET AL: "Design and production of novel tetravalent bispecific antibodies [see comments]." NATURE BIOTECHNOLOGY, (1997 FEB) 15 (2) 159-63. , XP000647731 page 159 -page 160</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-22
T	<p>KIPRIYANOV S M ET AL: "Bispecific tandem diabody for tumor therapy with improved antigen binding and pharmacokinetics." JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, (1999 OCT 15) 293 (1) 41-56. , XP002131382 the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DE 99/01350

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

See supplemental sheet Additional Matter PCT/ISA/210

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DE 99/01350

Continuation of Field I.1

Although Claims Nos. 21 and 22 relate to a diagnostic method which is conducted on the human/animal body or to a method for treatment of the human/animal body, the search was carried out and was based on the cited effects of the multivalent Fv antibody construct.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 99/01350

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C07K16/00 C07K16/28 C12N15/63 A61K39/395 G01N33/53

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 A61K C07K G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	GRUBER M ET AL: "Efficient tumor cell lysis mediated by a bispecific single chain antibody expressed in Escherichia coli." JOURNAL OF IMMUNOLOGY, (1994 JUN 1) 152 (11) 5368-74. , XP000872832 das ganze Dokument	1,4, 10-14, 21,22
X	MACK M ET AL: "A small bispecific antibody construct expressed as a functional single-chain molecule with high tumor cell cytotoxicity." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, (1995 JUL 18) 92 (15) 7021-5. , XP000566333 das ganze Dokument	1,2,4, 10-14, 21,22

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☐ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

23. Februar 2000

Abendedatum des internationalen Recherchenberichts

17.03.00

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3018

Bevollmächtigter Bediensteter

Mennessier, T

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Ints.ionales Aktenzeichen

PCT/DE 99/01350

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	KURUCZ I ET AL: "Retargeting of CTL by an efficiently refolded bispecific single-chain Fv dimer produced in bacteria." JOURNAL OF IMMUNOLOGY, (1995 MAY 1) 154 (9) 4576-82. , XP000872833 das ganze Dokument	1,4,5, 10-14, 21,22
X	DE JONGE J ET AL: "Production and characterization of bispecific single-chain antibody fragments." MOLECULAR IMMUNOLOGY, (1995 DEC) 32 (17-18) 1405-12. , XP000872314 das ganze Dokument	1,4,5, 10-14, 21,22
A	COLOMA M J ET AL: "Design and production of novel tetravalent bispecific antibodies 'see comments!'" NATURE BIOTECHNOLOGY, (1997 FEB) 15 (2) 159-63. , XP000647731 Seite 159 -Seite 160	1-22
T	KIPRIYANOV S M ET AL: "Bispecific tandem diabody for tumor therapy with improved antigen binding and pharmacokinetics." JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, (1999 OCT 15) 293 (1) 41-56. , XP002131382 das ganze Dokument	1-22

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE 99/01350

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen,
daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/DE 99/01350

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.1

Obwohl die Ansprüche 21 und 22 sich auf ein Diagnostizierverfahren, das am menschlichen/tierischen Körpers vorgenommen wird, bzw auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen des multivalenten Fv-Antikörper-Konstruktes.